



Rôle des glutamine synthétases cytosoliques et des asparagine synthétases dans le métabolisme azoté chez *Arabidopsis thaliana* et *Brassica napus*

Michaël Moison

► To cite this version:

Michaël Moison. Rôle des glutamine synthétases cytosoliques et des asparagine synthétases dans le métabolisme azoté chez *Arabidopsis thaliana* et *Brassica napus*. Biologie végétale. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. <NNT : 2014PA112394>. <tel-01246700>

HAL Id: tel-01246700

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01246700>

Submitted on 4 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : SCIENCES DU VÉGÉTAL
Institut Jean-Pierre Bourgin

DISCIPLINE : BIOLOGIE

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenance prévue le 18/12/2014

par

Michaël MOISON

**Rôle des glutamine synthétases cytosoliques et
des asparagine synthétases dans le métabolisme
azoté chez *Arabidopsis thaliana* et *Brassica napus***

Composition du jury :

Directeur de thèse : Dr Céline MASCLAUX-DAUBRESSE

Rapporteurs : Dr Julie CULLIMORE
Dr Philippe ETIENNE

Examineurs : Dr Michael HODGES
Dr Xavier PINOCHET

Directrice de recherche (INRA Versailles)

Directrice de recherche (INRA Toulouse)

Maître de conférences (INRA-Université de Caen-Basse Normandie)

Directeur de recherche (CNRS-Université Paris-Sud)

Expert scientifique (CETIOM)

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : SCIENCES DU VÉGÉTAL
Institut Jean-Pierre Bourgin

DISCIPLINE : BIOLOGIE

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenance prévue le 18/12/2014

par

Michaël MOISON

Rôle des glutamine synthétases cytosoliques et
des asparagine synthétases dans le métabolisme
azoté chez *Arabidopsis thaliana* et *Brassica napus*

Composition du jury :

Directeur de thèse : Dr Céline MASCLAUX-DAUBRESSE

Rapporteurs : Dr Julie CULLIMORE
Dr Philippe ETIENNE

Examineurs : Dr Michael HODGES
Dr Xavier PINOCHET

Directrice de recherche (INRA Versailles)

Directrice de recherche (INRA Toulouse)

Maître de conférences (INRA-Université de Caen-Basse Normandie)

Directeur de recherche (CNRS-Université Paris-Sud)

Expert scientifique (CETIOM)

Mes premiers remerciements vont, bien sûr, à ma directrice de thèse Céline Masclaux-Daubresse. Un immense merci pour ton encadrement durant ces trois années, pour m'avoir guidé et amené au bout de cette thèse. Merci beaucoup !

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté de juger mon travail. En premier lieu Julie Cullimore et Philippe Etienne, les deux rapporteurs, pour avoir accepté la lourde charge de travail de décortiquer mon manuscrit ainsi que les deux examinateurs, Xavier Pinochet et Michael Hodges, ce dernier pour avoir présidé le jury.

Xavier Pinochet faisait également partie de mon comité de thèse qui m'a suivi au cours de ces trois années. Je tiens à l'en remercier ainsi que les autres membres de ce comité : Alain Bouchereau, Mathilde Orsel ainsi que Yves Henry qui est venu assister à ces comités pour le compte de l'école doctorale. Au sein de l'école doctorale, merci également à Jacqui Shykoff, Marianne Delarue et Martine Fournier.

Merci à toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer et qui ont ainsi permis que cette thèse soit ce qu'elle est. Tout d'abord, Mathilde Orsel qui avait « essuyé les plâtres » pour l'étude des GS1 de colza et qui a toujours été disponible pour répondre à mes questions, nous transmettre les données qu'elle avait acquises et ainsi me permettre de mener mes expériences à bien, nous permettant de combiner nos résultats pour réaliser cette publication dans *J Exp Bot*. Merci à Alain Bouchereau et son équipe, notamment à Pascal Faës pour les graines de colza. Merci à Jean-Christophe Avice pour les analyses isotopiques et en particulier à Marie-Paule Bataillé, de son équipe, qui a passé tous mes échantillons (et il y en avait beaucoup !) ainsi que pour ses conseils pour leur préparation. Enfin, je tiens à remercier Boulos Chalhoub pour nous avoir donné accès à des séquences de colza non encore publiées et Jérémie Just qui m'a extrait les dites séquences et pour ses conseils concernant leur analyse. Sans ces séquences, nous n'aurions pas pu publier ce papier sous cette forme, donc merci beaucoup.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres des équipes Siren puis Saturn pour tout ce qu'ils ont pu m'apporter au cours de ces trois ans. Toutefois, certaines personnes méritent encore plus de remerciements que les autres. J'adresse donc mille mercis à Fabienne Soulay, technicienne dans l'équipe, dont l'aide a été plus que précieuse dans diverses manips. Merci également à Anne Marmagne et Marianne Azzopardi qui ont également été impliquées dans certaines expériences. En parlant d'expériences, petite parenthèse pour adresser un grand merci à Halima pour tous ses conseils et son aide pour les expériences d'hybridation in situ (et pour les makrouts pour mon pot de soutenance !) ainsi qu'aux autres membres de la plateforme de cytologie qui m'ont apporté leur aide (Adeline, Nero et Aurélie). Retour à l'équipe et merci à Akira Suzuki pour ses conseils, entre autres sur les ASN, ses amorces, ses mutants et sa disponibilité. Merci également à Michèle Reisdorf-Cren pour ses conseils, son aide, ses relectures et son aide pour avoir arrangé la situation à la suite de mes vacances à l'UVSQ...

Merci à l'ensemble des serristes pour avoir pris soin de mes plantes et plus particulièrement à Joël, Philippe, Michel, Sébastien et Amélie. Merci à l'ensemble de l'équipe administrative, notamment Vanessa. Merci également à Sébastien et Jérôme du magasin, ce fut un plaisir d'effectuer ma responsabilité commune à leur contact. Merci aussi à Magali Bedu, ma co-responsable « plastiques », on a fait une bonne équipe ! Et oui je râle mais je n'en aurais pas besoin si les gens ne vidaient pas les placards sans nous le dire ! ;-)

Je remercie l'ensemble des membres de l'IJPB avec qui j'ai pu avoir des contacts et notamment l'ensemble des habitants du bâtiment 3 pour la bonne humeur qui règne au sein de celui-ci. Merci aussi aux autres thésards, stagiaires, post-docs ou autres qui ont participé aux bars du jeudi soir (Trop de monde à citer...).

Merci à Carlos « Comment je m'appelle ? », le prof de salsa et mes compagnons de danse : Laure, Pascal, Marjolaine, Magali ainsi que tous les autres, ces cours de danse du jeudi midi ont été très agréables et m'ont permis de m'aérer l'esprit !

Merci aux membres de Doc' en herbe qui se sont succédés au fil des ans, les plus anciens (Sébastien, Laurie, Marie), ceux en même année (Viviane, Linda la factrice, Manon, Céline, Marie-Cap et bien sûr mes deux présidents préférés, Chloé et Stéphane !) et les petits nouveaux (Lucille, Yasmine, Aurélien...) et les autres que je n'ai pas cité...

Merci aux thésards du bâtiment 3. D'abord Laure, comme tu me l'as écrit, on a souffert ensemble, au début de notre thèse surtout..., et jusqu'à la fin ensemble ! Merci pour tout, les soirées, les cinés, la salsa, le voyage à Londres, le congrès en Irlande etc... Bonne continuation à toi ! Merci à Giorgia (tiens bon !), Liliana, Catherine et Mahsa pour leur gentillesse et bonne humeur. Une pensée également pour les deux parisiens qui nous ont rejoints vers la fin de leur thèse (ouf, ils étaient sympas ! ;-)) et qui ont fini avant nous, Aude et Alban (merci pour les Doctor Who !). Enfin, merci à Camille C, Julien et Camille S (pas encore thésard hélas, mais il a intérêt à avoir son concours cette année sinon gare à lui !) pour... plein de choses (!), les cinés, les soirées, les sorties, les pauses du goûter, tous les fous rires et les potins... Bref, tous les bons moments passés ensemble ! Vous allez grave me manquer ! Merci Camille pour ces vacances dans le sud. Merci Julien et Yoan pour vos cadeaux superflus alors que c'était un plaisir de garder ma nièce ! Merci Camille pour m'avoir accompagné à la piscine, c'est plus motivant à deux ! Je crois que je vais le garder longtemps ce record, non ? (tu dois en faire 63 pour le battre ! ;-))... Merci aussi à Marie-Jeanne pour sa bonne humeur, sa gentillesse et également pour sa participation à la pause de l'après midi (enfin quand le téléphone de son bureau ne sonnait pas... ;-)).

Merci à tous mes anciens chefs qui ont fait que je sois arrivé jusque-là : David, Martine, Françoise, Florian, Axel et bien sûr Magali.

Merci à ma famille, notamment mes parents, mes grands-mères, mon frère, Véronique et ma cousine préférée (même si c'est la seule ;-)).

Pour finir, je voudrais remercier mes « autres amis », ceux du lycée pour ces soirées repas/jeux chez les uns ou chez les autres (et les deux enquiquineurs, vous avez intérêt à continuer à trouver des jours où vous n'êtes pas en service tous les deux !) ; ceux du DUT, les 5 doigts de la main, une amitié qui dure depuis presque 10 ans maintenant, et ce malgré les uns et les autres dispersés de par le monde ! Un jour on sera réuni quelque part ! Et pas solo sur whatsapp... ;-)) (Je dis ça mais peut être que la prochaine fois je serais celui qui manquera à l'appel !). Merci à Valentin qui est également loin mais avec qui le contact ne s'est jamais arrêté non plus. Merci à ceux rencontrés durant mes études : Emeline, Élodie, Anouck et bien sûr Axel. Et merci à Manoël, plus de 25 ans d'amitié...no comment.

Maintenant, place à la science !

Introduction.....	1
I Le colza, culture d'intérêt agronomique	1
1) Description et origine.....	1
2) Agronomie (Source : CETIOM)	1
3) Cycle de développement (Figure I-3 ; Source : CETIOM)	2
4) Valorisation (source : PROLEA).....	3
5) Evolution des rendements entre 1961 et 2012 (source : FAOSTAT, accès 12/05/14).....	3
6) Fertilisants azotés et problèmes associés	4
7) Sélection variétale et amélioration génétique du colza.....	6
8) Efficacité d'utilisation de l'azote chez le colza	6
9) Relations phylogénétiques entre Arabidopsis et le colza	8
II Métabolisme de l'azote chez les plantes.....	10
1) Les sources d'ammonium chez les plantes	10
1.1) Absorption racinaire de l'ammonium	10
1.2) Absorption racinaire du nitrate et réduction en ammonium	11
1.3) La photorespiration.....	12
1.4) Le catabolisme des composés azotés, source d'ammonium	13
2) Le cycle GS/GOGAT, principale voie d'assimilation de l'ammonium	14
2.1) La Glutamine Synthétase.....	14
2.2) La glutamate synthase	15
3) Transport de l'azote au sein de la plante lors de la remobilisation des composés azotés	15
3.1) Voies et formes de transport	15
3.2) Les transporteurs d'acides aminés et de peptides.....	16
III GS et AS, acteurs clés de l'assimilation de l'ammonium.....	18
1) Glutamine Synthétases	18
1.1) Réaction catalysée et structure quaternaire.....	18
1.2) La glutamine synthétase chez les plantes	18
1.3) La régulation des glutamine synthétases cytosoliques : un processus à plusieurs niveaux ..	22
2) Asparagine Synthétases	23
2.1) Réaction catalysée et structure quaternaire.....	23
2.2) L'asparagine synthétase chez les plantes	24
3) Efforts biotechnologiques sur les GS et les AS pour la manipulation de la NUE.....	27
4) Métabolisme azoté et gestion des stress biotiques et abiotiques.....	28
IV Objectifs de recherche	31

I La famille <i>GLN1</i> chez <i>Brassica napus</i> : identification et analyse de l'expression en fonction de la sénescence et de la disponibilité en azote.....	33
1) Introduction	33
2) Article : Orsel et al (2014).....	34
3) Conclusion et perspectives.....	56
II Étude de l'expression des gènes <i>GLN1</i> chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	58
1) Introduction	58
2) Materials and methods	60
3) Results	62
4) Discussion.....	65
III Remobilisation de l'azote dans les mutants des glutamine synthétases cytosoliques chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	71
1) Introduction	71
2) Materials and methods	73
3) Results	75
4) Discussion.....	77
IV Étude de la famille des asparagine synthétases chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	80
1) Introduction	80
2) Matériels et méthodes.....	80
3) Résultats.....	81
3.1) Expression des gènes <i>ASN</i> au sein de la plante par qPCR.	81
3.2) Phénotypage des géotypes <i>asn</i> mutants par marquage ¹⁵ N.	82
4) Discussion.....	84
Références bibliographiques.....	93

Liste des figures et des tableaux

Introduction

I Le colza, culture d'intérêt agronomique

Figure I-1. Colza et triangle de U

Figure I-2. Évolution des surfaces cultivées par du colza en France entre 1961 et 2012

Figure I-3. Cycle de développement du colza

Figure I-4. Valorisation du colza

Tableau I-1. Données mondiales de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

Figure I-5. Évolution de la consommation en fertilisants azotés dans le monde entre 1961 et 2011

Figure I-6. Prévisions de croissance de la population mondiale

Figure I-7. Zones vulnérables en 2012 au sens de la directive Nitrates

Figure I-8. Flux d'azote au cours du cycle de développement du colza

Figure I-9. Duplications récurrentes chez *B. napus*

II Métabolisme de l'azote chez les plantes

Figure II-1. Les transporteurs de nitrate chez *Arabidopsis*

Figure II-2. La photorespiration

III GS et AS, acteurs clés de l'assimilation de l'ammonium

Figure III-1. Structure de la GS1a de maïs

Figure III-2. Profil électrophorétique des glutamine synthétase

Figure III-3. Principales voies du métabolisme azoté dans les cellules des feuilles jeunes et des feuilles sénescentes

Tableau III-1. Gènes *GLN* d'*Arabidopsis thaliana*

Figure III-4. Spécificité de l'expression des gènes *GLN1* d'*Arabidopsis* au niveau racinaire

Figure III-5. Phénotype des épis des mutants de maïs déficients en GS1

Figure III-6. Vue d'ensemble des mécanismes de régulation des GS1

Figure III-7. Structure de l'AS de type B d'*Escherichia coli*

Tableau III-2. Gènes *ASN* d'*Arabidopsis thaliana*

Figure III-8. Régulation des gènes *ASN1* et *ASN2* d'*Arabidopsis*

Figure III-9. Fonctions du métabolisme du glutamate de l'hôte et stratégies de virulence des agents pathogènes

Figure III-10. Stratégie de virulence du pathogène versus métabolisme du glutamate de l'hôte

Résultats

II Étude de l'expression des gènes *GLN1* chez *Arabidopsis thaliana*

Table II-S1. List of primers used in this study

Figure II-S1. *AtGLN2* expression depends on organs, nitrate conditions and ageing

Figure II-1. *Arabidopsis GLN1* genes expression depends on organs, nitrate conditions and ageing

Figure II-2. *Arabidopsis GLN1* genes expression depends on nitrate and carbon sources

Figure II-3. GS immunolocalization in cauline leaves

Figure II-4. Expression of *ProGLN1;x:uidA* transcriptional fusions in plants

Figure II-5. GUS staining of *ProGLN1;x:uidA* in leaves

Figure II-6. GUS staining of *ProGLN1;x:uidA* in flowers

Figure II-7. Expression of *GLN1* genes in transverse sections of leaves

Figure II-8. Schematic representation of *GLN1* genes in plant

Figure II-9. Schematic representation of *GLN1* expression patterns in veins

III Remobilisation de l'azote dans les mutants des glutamine synthétases cytosoliques chez *Arabidopsis thaliana*

Table III-S1. mutant lines used in this study

Table III-S2. List of primers used in this study

Figure III-1. Characterization of *gln1* knockout mutants

Figure III-2. Nitrogen uptake and plant biomass of *gln1* mutants

Figure III-3. Yield and biomass of *gln1* knockout mutants

Figure III-4. Determination of wild-type and *gln1* knockout mutants N concentrations in seeds

Figure III-5. ¹⁵N partitioning in wild-type and *gln1* knockout mutants

IV Étude de la famille des asparagine synthétases chez *Arabidopsis thaliana*

Figure IV-1. Caractérisation des mutants *asn* d'*Arabidopsis*

Figure IV-2. Arabidopsis *ASN* genes expression depends on organs, nitrate conditions and ageing

Figure IV-3. Arabidopsis *ASN* genes expression depends on nitrate and carbon sources

Figure IV-4. Nitrogen uptake and plant biomass of *gln1* mutants

Figure IV-5. Yield and biomass of *gln1* knockout mutants

Figure IV-6. Determination of wild-type and *gln1* knockout mutants N concentrations in seeds

Figure IV-7. ^{15}N partitioning in wild-type and *gln1* knockout mutants

Tableau IV-1. Liste des amorces utilisées au cours de cette étude

Annexes

Annexe 1. Revue Avila-Ospina, Moison et al. 2014

Annexe 2. Rapport de stage de Camille Soulard, M2, juin 2014

INTRODUCTION

A

B

Figure I-1. (A) Colza en champ au stade floraison, présentant des fleurs jaunes caractéristiques (Oklahoma State University, North Dakota State University, <http://www.animalimagegallery.org/>). (B) « Triangle de U », Schéma représentant les relations de parenté entre les différentes espèces du genre *Brassica*. (d'après Nagaharu U, 1935).

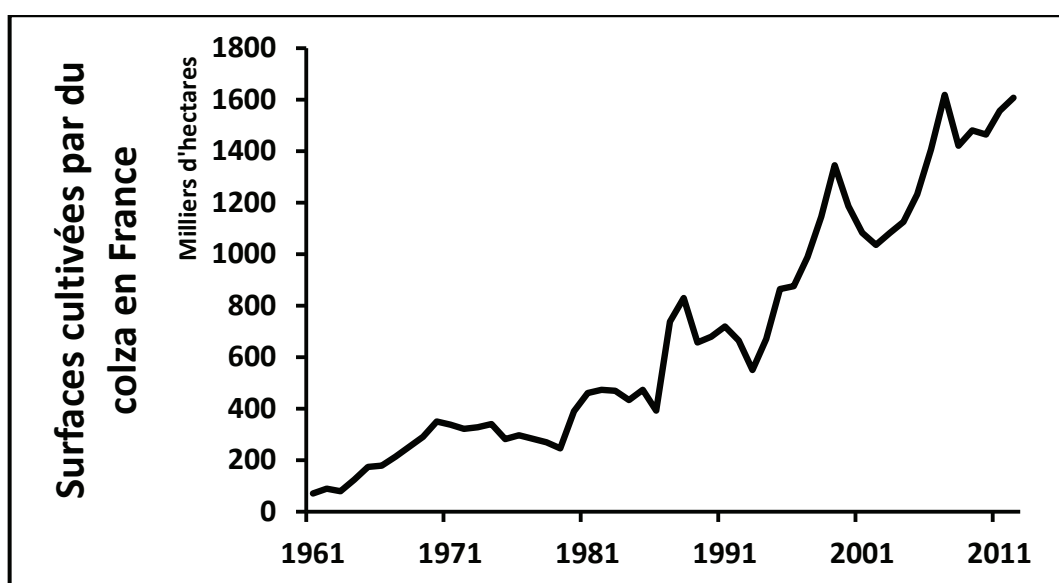


Figure I-2. Évolution des surfaces cultivées par du colza en France entre 1961 et 2012. (source : FAOSTAT, accès 12/05/14).

I Le colza, culture d'intérêt agronomique

1) Description et origine

Le colza, *Brassica napus* L., est une dicotylédone d'intérêt agronomique, à fleurs jaunes (Figure I-1A), de la famille des Brassicacées (Brassicaceae). Cette espèce est allopolyploïde, plus précisément amphidiploïde ($4n = 38$, génome AACCC), car issue du croisement entre deux espèces diploïdes proches, un chou (*Brassica oleracea* L., $2n = 18$, génome CC) et une navette (*Brassica rapa* L., $2n = 20$, génome AA). Le « Triangle de U » (Figure I-1B) décrit les relations entre trois espèces diploïdes du genre *Brassica* et les espèces issues des différents croisements interspécifiques possibles entre ces trois espèces (Nagaharu U, 1935). L'origine du croisement ayant abouti à la formation du colza reste, à ce jour, inconnue mais résulterait probablement du rapprochement, au sein des systèmes de culture mis en place par l'homme, des deux espèces progénitrices cultivées pour la consommation humaine ou la production d'huile. En effet, le colza sauvage est peu trouvé dans la nature et principalement sous la forme échappée du colza cultivé (Gómez-Campo and Prakash, 1999). Plusieurs événements de croisement interspécifique indépendants se seraient produits. Ceux-ci auraient fait intervenir différents génotypes maternels bien qu'une variété de *Brassica rapa* serait plus particulièrement à l'origine du cytoplasme de *Brassica napus* (Allender and King, 2010).

2) Agronomie (Source : CETIOM)

Il existe deux types de colza distincts se caractérisant par des périodes et des durées de cycle cultural différentes. L'appellation « colza de printemps » regroupe les variétés qui ne supportent pas les hivers trop rigoureux et n'ont pas besoin de vernalisation. Ainsi, ce type de colza est semé en fin d'hiver ou début de printemps (lorsque la température du sol atteint environ 7°C à 5 cm de profondeur) et présente un cycle de développement rapide d'environ 6 mois. Au contraire, le colza dit « d'hiver » regroupe les variétés robustes pouvant survivre à des températures négatives et ayant besoin d'une période de vernalisation afin de développer des parties aériennes. Le colza d'hiver est semé pendant l'été et subit une première phase de développement végétatif jusqu'à la chute des températures qui permet la vernalisation de la plante. La reprise de végétation se fait avec la remontée de ces températures et permet l'apparition des structures aériennes. Au 8 avril 2014, les estimations du CETIOM portaient à 1 530 784 hectares les surfaces cultivées en colza en France, soit plus de 20 fois ce qu'elles étaient en 1961 (Figure I-2), et avec seulement 5 789 hectares semés avec du colza de printemps, soit seulement 0,38% de la superficie totale cultivée en colza. En effet, la culture du colza de printemps en France se fait surtout à la suite de retournement (destruction) de culture de colza d'hiver. Toutefois, ce retournement est préconisé uniquement lorsque les dégâts provoqués par les conditions climatiques défavorables et observés, en sortie d'hiver, sur les cultures

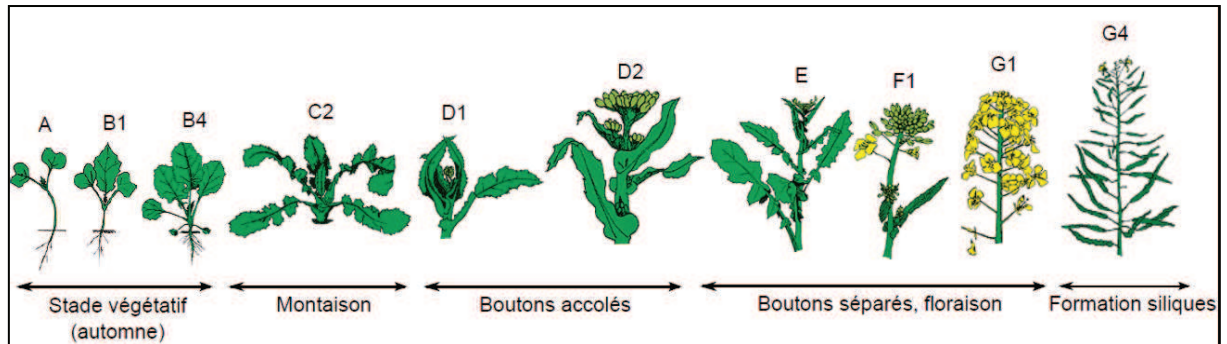


Figure I-3. Cycle de développement du colza. Le stade précis est indiqué au-dessus de chaque schéma. (d'après CETIOM).

sont trop importants et que la culture est trop compromise, et ce malgré les fortes capacités de récupération du colza. Du fait de la prépondérance de la culture du colza d'hiver en France et en Europe, il sera plus particulièrement traité de celui-ci dans ce manuscrit.

Le premier intérêt agronomique à la culture du colza est son rôle de « piège à nitrates » qui permet, par son absorption, la rétention de l'azote dans la partie utilisable du sol en empêchant son lessivage. Le colza est donc un bon précédent de culture et a, de ce fait, une place importante dans les rotations culturales au champ. Pour exemple, un blé cultivé suite à une culture de colza a, en moyenne, un rendement augmenté de 10% par rapport à une culture de blé effectuée suite à une culture de blé. Cette alternance de cultures a également l'intérêt de casser le cycle des maladies des autres espèces cultivées sur la même parcelle (notamment celles du blé). Enfin, autre intérêt agronomique, le colza développe une racine en pivot qui provoque un travail du sol en profondeur.

3) Cycle de développement (Figure I-3 ; Source : CETIOM)

Le colza d'hiver est semé à une densité d'environ 45 graines au mètre carré et la date optimale de semis en France se situe entre fin août et début septembre suivant la région considérée. Le cycle de développement est divisé en deux parties distinctes : automne et sortie d'hiver. En effet, il débute à l'automne par la levée des graines puis l'apparition des deux cotylédons (stade cotylédonaire, stade A), puis, avant l'entrée dans l'hiver, par l'apparition des premières vraies feuilles, dont les pétioles se superposent directement sans que des entre-nœuds (et de ce fait une tige) n'apparaissent, aboutissant à la formation de la rosette (stade B). Le colza étant capable de supporter des températures allant jusqu'à -15°C (la température létale se situant à environ -18°C), il rentre ensuite en repos végétatif, pendant la période hivernale, jusqu'à la remontée des températures en sortie d'hiver/début de printemps. La reprise de végétation se manifeste alors par l'apparition de nouvelles feuilles et la croissance des entre-nœuds (apparition de la tige), phénomène définissant le stade montaison (stade C). Le stade D correspond au stade de développement au cours duquel les boutons floraux sont encore accolés les uns aux autres. On distingue, tout d'abord, le stade D1 au cours duquel les boutons accolés sont encore cachés par les feuilles terminales, puis le stade D2 pendant lequel l'inflorescence principale est dégagée, les inflorescences secondaires sont visibles et la tige atteint, et dépasse, la hauteur de 20 cm entre la base de la rosette et les bouquets floraux. L'allongement des pédoncules floraux, de la périphérie vers le centre, permet de définir le stade E, boutons séparés avant le stade de la floraison (stade F). Ce dernier se divise en différents sous-stades en fonction du nombre de fleurs ouvertes et de l'allongement de la hampe florale. Enfin, la fécondation des fleurs aboutit à la formation des siliques (stade G) et des graines. Différents sous-stades de développement peuvent également être caractérisés au sein de ce stade. Le stade G1

A

B

Figure I-4. Valorisation du colza. (A) Composition d'une graine de colza (source : PROLEA).
(B) Devenir des graines de colza (source : CETIOM).

correspond à la chute des premiers pétales alors que la floraison des inflorescences secondaires commence juste. Les 10 premières siliques ont alors une longueur inférieure à 2 cm. Les stades G2 et G3 correspondent à une longueur des 10 premières siliques comprise entre 2 et 4 cm et supérieure à 4 cm, respectivement. Au stade G4, les 10 premières siliques sont bosselées et au stade G5, les graines sont colorées. Il convient de noter qu'un stade de développement est atteint lorsque 50% des plantes sont à ce stade. La récolte se fait, quant à elle, fin juin/début juillet, lorsque la graine atteint 9% d'humidité.

4) Valorisation (source : PROLEA)

En tant qu'espèce oléagineuse, la principale valorisation du colza est l'extraction de l'huile contenue dans les graines (Figure I-4). Cette huile tient une place importante dans la consommation humaine car elle est principalement utilisée dans l'industrie agro-alimentaire et tient la deuxième place parmi les huiles de table derrière l'huile de tournesol. L'huile de colza est constituée à plus de 60% d'acide oléique, à 30 % d'acides gras polyinsaturés, dont 21 % d'acide linoléique (précurseur des acides gras oméga 6) et 9 % d'acide alpha-linolénique (précurseur des acides gras oméga 3), et seulement environ 8% d'acides gras saturés. Cette composition fait de l'huile de colza une huile recommandée pour la prévention des maladies cardio-vasculaires. La trituration des graines pour obtenir l'huile de colza conduit à la formation d'un co-produit désigné sous l'appellation de tourteau de colza. Ce terme désigne la matière restante (environ 55% de la graine) après extraction de l'huile. Les tourteaux sont utilisés directement en alimentation animale, principalement pour l'alimentation des bovins (65%) et celle des porcs (30%) ainsi qu'à une faible proportion pour celle des volailles, ou bien sont utilisés pour l'extraction des protéines qu'ils contiennent et qui seront utilisées en tant qu'ingrédient alimentaire. De plus, le colza peut également être utilisé en tant que culture fourragère bien que cette utilisation reste marginale.

L'huile végétale issue du colza peut, après transformation, être incorporée dans le gazole et ainsi servir de biocarburant. L'utilisation de l'huile pure reste rare et nécessite des aménagements dans les moteurs. Enfin, d'autres bio-produits peuvent également être formés à partir de l'huile de colza : bio-lubrifiants, tensio-actifs, solvants ou encore encres.

5) Evolution des rendements entre 1961 et 2012 (source : FAOSTAT, accès 12/05/14)

A partir des années 1940 et, de façon plus marquée, des années 1960, l'investissement dans la recherche agronomique a augmenté considérablement, les infrastructures se sont développées et des politiques économiques concertées se sont mises en place à l'échelle mondiale. L'ensemble de

Espèce cultivée	Surface cultivée (Ha)			Production (tonnes)			Rendement (Hg/Ha)		
	1961	2012	Facteur	1961	2012	Facteur	1961	2012	Facteur
Orge	54 518 640	49 525 988	0.91	72 411 104	132 886 519	1.84	13 282	26 832	2.02
Maïs doux	761 548	1 125 916	1.48	4 090 149	9 764 006	2.39	53 708	86 721	1.61
Maïs	105 559 708	177 379 507	1.68	205 027 583	872 066 770	4.25	19 423	49 164	2.53
Pomme de terre	22 147 976	19 202 082	0.87	270 552 196	364 808 768	1.35	122 157	189 984	1.56
Colza	6 277 273	34 085 066	5.43	3 595 525	65 058 240	18.09	5 728	19 087	3.33
Riz	115 365 135	163 199 090	1.41	211 828 863	719 738 273	3.40	18 362	44 102	2.40
Sorgho	46 009 146	38 161 647	0.83	40 931 625	57 004 922	1.39	8 896	14 938	1.68
Soja	23 818 820	104 997 253	4.41	26 882 808	241 841 416	9.00	11 286	23 033	2.04
Blé	204 209 450	215 489 485	1.06	222 357 231	670 875 110	3.02	10 889	31 133	2.86

Tableau I-1. Données mondiales de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. Évolution des surfaces cultivées, de la production et du rendement entre 1961 et 2012 et facteurs de croissance associés. (d'après FAOSTAT, <http://faostat3.fao.org/home/E>).

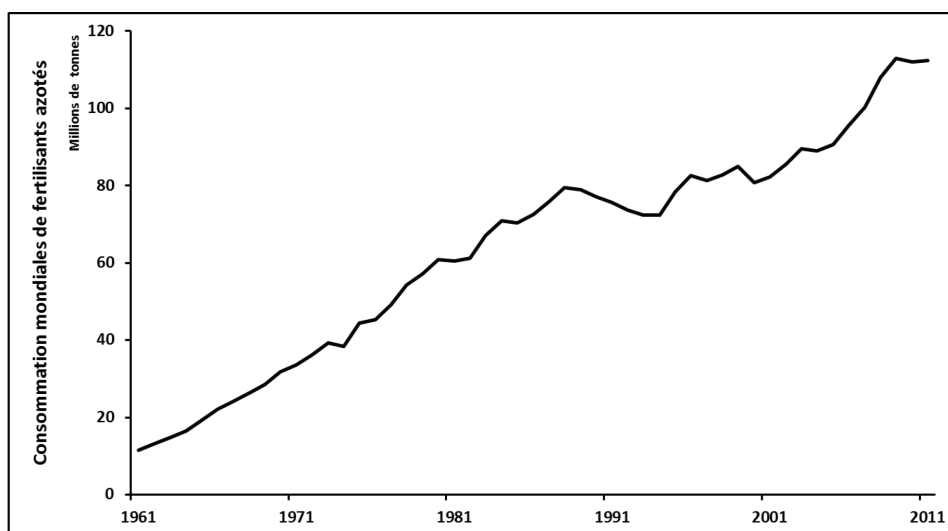


Figure I-5. Évolution de la consommation en fertilisants azotés dans le monde entre 1961 et 2011. (source : FAOSTAT, accès 12/05/14).

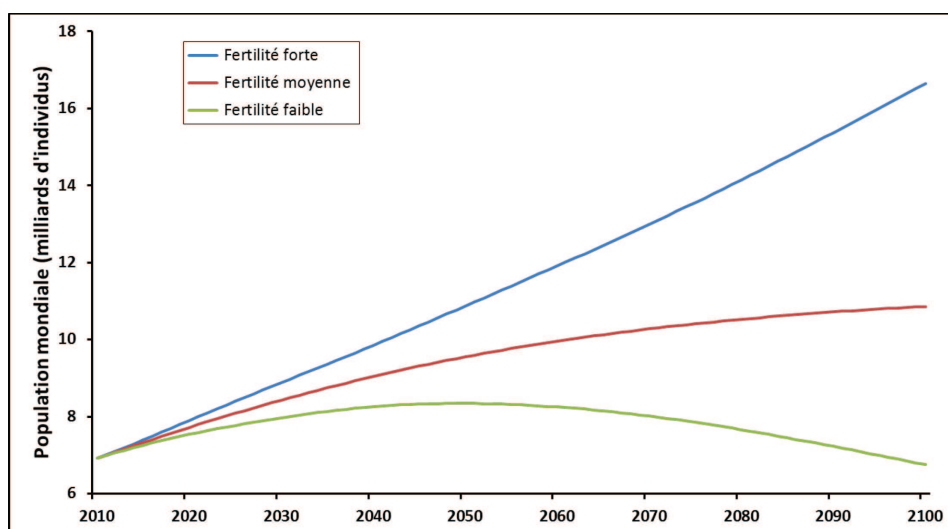


Figure I-6. Prévisions de croissance de la population mondiale à l'horizon 2100 selon trois scénarii (taux de fertilité fort, moyen ou faible). (Source : Nations Unies, Division de la population, World Population Prospects: The 2012 Revision).

ces phénomènes, que l'on désigne sous le terme de « Révolution verte », a permis une augmentation considérable de la productivité agricole sur les 50 dernières années. Le tableau I-1 montre l'évolution des surfaces cultivées, de la production et des rendements associés pour les principales cultures mondiales (orge, maïs, pomme de terre, colza, riz, sorgho, soja et blé) entre 1961 et 2012. On peut noter que la production a augmenté pour toutes les espèces considérées alors même que, pour certaines d'entre elles, la surface cultivée a diminué (toutefois, le facteur d'augmentation est, dans ce cas, relativement faible et inférieur à 2). Le colza est la culture présentant l'augmentation la plus importante, la production ayant été multipliée par 18 car les surfaces cultivées ont quintuplées et le rendement a plus que triplé sur cette même période. Cette évolution de la productivité (les rendements ayant augmenté d'un facteur 1,56 à 3,33 selon la culture) s'est basée sur la création de variétés à haut rendement obtenue par sélection variétale, sur la mécanisation des pratiques et sur la création de conditions de cultures qui visent à se rapprocher des conditions optimales (i.e. l'irrigation et l'utilisation d'intrants (engrais et pesticides) ont joué un rôle de premier ordre dans l'augmentation de la productivité observée) (Pingali, 2012). L'emploi massif d'intrants azotés a notamment été un critère de première importance car environ 112 millions de tonnes de fertilisants azotés au total ont été appliqués sur les cultures en 2012 contre seulement 11 millions en 1961 (soit une augmentation de plus de 1000%) (Figure I-5).

La population mondiale est en constante augmentation et est censé atteindre plus de 10 milliards d'individus à l'horizon 2100 (Figure I-6 ; ONU, <http://esa.un.org/unpd/wpp/index.htm>). La majeure partie de cette augmentation se fera dans les pays en voie de développement avec une forte hausse de la demande en nourriture afin d'obtenir la sécurité alimentaire. Ainsi, la production globale de nourriture doit croître d'environ 70% (50% dans les pays en voie de développement) à l'horizon 2050 alors que l'urbanisation des populations ne cesse de s'intensifier et que, dans le même temps, de plus en plus de terres cultivables sont utilisées pour la production de biodiesel (FAO, 2009). Les fertilisants azotés continueront, de ce fait, de jouer un rôle prépondérant dans la sécurité alimentaire globale, notamment dans la réponse à la demande nutritionnelle en azote.

6) Fertilisants azotés et problèmes associés

Les intrants azotés sont synthétisés par le procédé Haber-Bosch à partir du diazote (N_2) de l'air et du méthane (CH_4). Ce dernier, à la fois matière première et source d'énergie nécessaire au procédé est indexé sur le coût du pétrole. Ainsi, l'application de fortes quantités de fertilisants azotés a permis de couvrir les demandes des cultures et ainsi de maximiser la productivité de celles-ci, mais a conduit à plusieurs effets négatifs annexes. Tout d'abord, il est à noter que ces pratiques présentent un fort coût économique pour les producteurs, tant au niveau du coût propre des intrants

Figure I-7. Zones vulnérables en 2012 au sens de la directive Nitrates (Source : Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie).

que ceux associés à leur application (énergie nécessaire à l'utilisation des machines) (Duffy, 2014). D'autre part, les fortes quantités de fertilisants apportées posent un certain nombre de problèmes environnementaux. En effet, le lessivage des composés azotés vers les nappes phréatiques entraîne une pollution des eaux de consommation, nécessitant une dépollution coûteuse (Singh, 2005), et des cours d'eaux pouvant conduire à l'eutrophisation des milieux aquatiques à cause d'un développement massif d'espèces aquatiques (algues notamment). Afin de lutter contre ce phénomène, les instances européennes ont produit, en 1991, la directive 91/676/CEE dite « Nitrates » qui impose aux états membres un objectif de réduction de la pollution des eaux (de surface et souterraines) par les nitrates d'origine agricole. En France, cette directive a été transposée par la définition de « zones vulnérables », pour lesquelles les teneurs en nitrates détectées dans les eaux dépassent les limites autorisées, et pour lesquelles des programmes d'action ont été établis dans le but de réduire ces teneurs (Figure I-7). Les anciens programmes d'action ont été jugés trop peu rigoureux au regard des exigences de la directive et ont conduit à la condamnation de la France par la cour de justice de l'Union Européenne en septembre 2014. De plus, il est à noter qu'une mauvaise qualité des eaux d'un point de vue des nitrates pourra également empêcher de remplir les conditions de « bon état écologique » des eaux imposées par la directive européenne 2000/60/CE dite « Cadre sur l'eau » et amener de nouvelles condamnations.

L'application des intrants azotés a également un impact à la fois économique et environnemental en relation avec l'air. En effet, la volatilisation de l'ammoniac issu des engrais azotés provoque une pollution atmosphérique avec une baisse de la qualité de l'air ainsi qu'une perte financière non négligeable (Rochette, 2008). La production de protoxyde d'azote (N_2O) par les sols cultivés est également un problème de premier plan car il s'agit du principal gaz à effet de serre produit par l'agriculture (Viard et al., 2013). Cette production est naturelle, consécutive aux processus de nitrification et dénitrification mis en œuvre par les bactéries du sol, mais la production des sols est en général plus importante que sa consommation car elle dépend en partie des pratiques culturales mises en œuvre (Viard et al., 2013).

L'ensemble des éléments cités ci-dessus amènent à la conclusion qu'une connaissance accrue des mécanismes gouvernant l'utilisation de l'azote par les plantes pourra permettre de réduire les quantités d'intrants azotés appliqués sur les cultures et ainsi, dans le même temps, diminuer ou au moins atténuer les problèmes environnementaux et économiques associés. Les deux chapitres suivants s'intéressent, d'une part aux efforts d'amélioration génétique du colza effectués à ce jour, et, d'autre part, à l'étude de l'efficacité globale d'utilisation de l'azote chez cette même espèce.

7) Sélection variétale et amélioration génétique du colza

Originellement, le colza est une plante riche en glucosinolates et son huile contenait une forte proportion (50% environ) d'acide érucique, composés qualifiés d'antinutritionnels car provoquant des effets négatifs sur le cœur pour l'acide érucique (Charlton et al., 1975), ou des perturbations hormonales ayant des effets délétères chez les animaux pour les glucosinolates (Alexander et al., 2008). Chez l'homme, les glucosinolates pourraient plutôt avoir un rôle bénéfique en termes de lutte contre certains pathogènes humains comme *Helicobacter pylori*, ainsi que dans la lutte contre le cancer (Ishida et al., 2014). Cependant, les efforts d'amélioration génétique du colza s'étaient, dans les années 70, concentrés sur la baisse de la teneur de l'huile en acide érucique (moins de 2% de la composition en huile) et l'obtention d'une faible teneur en glucosinolates dans les tourteaux (diminution de 80%). L'obtention de ces deux caractères a permis la production de variétés dites « double 0 », pauvres en ces deux composés.

A l'heure actuelle, les efforts de sélection se concentrent notamment sur l'obtention de variétés ayant une composition en huile dans les graines modifiées sans perte de rendement, sur l'augmentation du contenu en huile et en protéines des graines, sur la diminution de certains composés antinutritionnels (glucosinolates, tannins condensés, sinapine) et sur une augmentation encore plus importante des rendements (Nesi et al., 2008; Abbadi and Leckband, 2011). Dans le futur, la principale variable d'amélioration devra être la capacité d'adaptation à l'environnement (chaleur, diminution des apports en eau, résistance aux agresseurs) au vu de changements climatiques et des modifications des pratiques culturales annoncés. Notamment, la nécessaire diminution des intrants culturels requiert la sélection de variétés adaptées à une culture sous faible azote et qui utilisent l'azote disponible de façon efficace.

8) Efficacité d'utilisation de l'azote chez le colza

L'efficacité globale d'utilisation de l'azote (ou NUE pour « Nitrogen Use Efficiency ») peut se définir par le rendement (en grain ou en biomasse aérienne selon le type de culture considérée) obtenu en fonction de la quantité d'azote disponible dans le sol. Elle tient compte de l'efficacité d'absorption (NUpE pour « Nitrogen Uptake Efficiency ») et de l'efficacité d'utilisation (NUtE pour « Nitrogen Utilization Efficiency ») de l'azote, ce dernier paramètre pouvant également être séparé en deux composantes distinctes : l'efficacité d'assimilation et celle de remobilisation (NRE pour « Nitrogen Remobilization Efficiency ») (Xu et al., 2012).

Le colza est une espèce qui présente de bonnes capacités d'absorption de l'azote à partir du sol, notamment au stade végétatif (Malagoli et al., 2004) justifiant son rôle de piège à nitrates au champ (CETIOM). Ces fortes capacités d'absorption reposeraient sur le fait que les feuilles sont de

A

B

Figure I-8. Flux d'azote au cours du cycle de développement du colza. (A) Flux d'azote endogène (flèches grises) et exogènes (flèches noires) en mg N. plante⁻¹ entre les stades C1 et G1. (B) Flux d'azote endogène (flèches grises) en mg N. plante⁻¹ entre les stades G1 et G5. (d'après Rossato et al, 2001, Figure 4). Les chiffres entre parenthèses indiquent la répartition de l'azote absorbé à partir du sol (à droite) ou mobilisé à partir des feuilles (à gauche).

grande taille chez cette espèce, ce qui induirait une forte transpiration, ayant pour conséquence des mouvements de la sève xylémienne et donc une absorption importante de solutés du sol (Laine et al., 1993). En dépit de cette importante capacité d'absorption de l'azote, seulement 50% de l'azote appliqué *via* les fertilisants azotés est retrouvé dans les graines à maturité (Schjoerring et al., 1995). Ainsi, le recyclage et la remobilisation de l'azote au sein de la plante jouerait un rôle important dans le remplissage du grain en représentant 75% de l'azote contenu dans les graines de colza (Malagoli et al., 2005a). En effet, l'azote prélevé dans le sol pendant la floraison ne serait pas forcément alloué au remplissage du grain, dans l'hypothèse où l'absorption d'azote se maintiendrait à un fort niveau pendant le stade reproducteur (Malagoli et al., 2005a). Il est cependant nécessaire de noter que cette absorption post-floraison est sujette à controverse, d'autres études comme celle de Rossato et al. (2001) ayant montré un arrêt total de celle-ci.

L'étude des flux au sein de la plante (Figure I-8) a permis de montrer que l'azote peut être mobilisé au stade végétatif à partir des feuilles sénescentes vers les feuilles en formation lors de la sénescence séquentielle, ainsi qu'au stade reproducteur des feuilles sénescentes vers les graines lors de la sénescence monocarpique (Malagoli et al., 2005a). Toutefois, cette mobilisation d'azote ne coïncide pas forcément avec une période de remplissage du grain, notamment lors de la sénescence séquentielle des feuilles les plus vieilles pendant laquelle il n'y a pas d'organes ayant une force de puit assez forte, à la différence des feuilles les plus jeunes dont la sénescence coïncide avec le remplissage (Malagoli et al., 2005a). A partir de ces données, les auteurs ont, dans une seconde publication, modélisé l'absorption de l'azote par la plante et montré que la synchronisation de la mobilisation de l'azote des feuilles avec le remplissage du grain (augmentation de la durée de vie des feuilles, diminution de leur contenu en azote à l'abscission ainsi que du contenu en azote de la tige) augmentait le transfert d'azote vers les graines (Malagoli et al., 2005b). Afin de contourner cet asynchronisme entre mobilisation et remplissage, le colza semble avoir développé un système de stockage temporaire de l'azote au niveau du pivot. En effet, un polypeptide de 23kDa s'accumule dans ce dernier lors de la floraison avant d'être hydrolysé lors de la phase de remplissage (Rossato et al., 2001). Récemment, le modèle cité plus haut a été revu et corrigé en appliquant une nouvelle approche permettant de prendre en compte la complexité structurelle de la racine (différents types de transporteurs en parallèles et en série) dans le processus d'absorption. Ainsi, les processus moléculaires ne sont pas pris en compte, seule l'efficacité de la racine en tant qu'unité catalytique est étudiée (Le Deunff and Malagoli, 2014). Grâce à ce modèle, les auteurs ont étudié l'implication des racines dans ce processus en montrant que la croissance des racines et des parties aériennes ne sont pas concomitantes chez le colza et que le maximum d'absorption a lieu lorsque les racines sont pleinement développées (Malagoli and Le Deunff, 2014).

Ainsi, le colza se caractérise par une faible NUE due à une utilisation de l'azote absorbé inefficace (mauvaise NUtE). Les capacités de remobilisation de l'azote des feuilles sénescentes (sources) vers les graines en formation (puits) étant faibles, les feuilles sénescentes sont encore riches en azote lors de leur chute aboutissant à une perte d'azote pouvant atteindre 15% de l'azote total (Rossato et al., 2001). Par conséquent, la NUE se trouve diminuée alors que, dans le même temps, les problèmes de pollution des eaux peuvent croître *via* les phénomènes de lessivage qui peuvent avoir lieu à la suite de ce retour important de l'azote au sol. Il existe donc une importante nécessité d'améliorer la NRE chez le colza mais cela passe par l'acquisition d'une meilleure connaissance des processus de remobilisation de l'azote chez cette espèce.

Les composés azotés qui participent à la remobilisation de l'azote sont transportés par l'intermédiaire de la sève phloémienne au sein de laquelle le glutamate, l'aspartate et leurs amides respectifs (glutamine et asparagine) figurent généralement parmi les principaux acides aminés. La concentration en acides aminés, et notamment en glutamine et asparagine, augmente dans la sève phloémienne lors de la sénescence (Feller and Fischer, 1994). Chez le colza, cette sève est enrichie en glutamate, glutamine, aspartate, et sérine notamment (Lohaus and Schwerdtfeger, 2014). L'asparagine est présente en plus faible quantité mais son rôle ne doit pas être sous-estimé car cet acide aminé permet un transport important d'azote au vu de son ratio N/C élevé (2/4). La glutamine est synthétisée par les glutamine synthétases (GS) à partir de glutamate et d'ammonium alors que l'asparagine est formée à partir de l'aspartate par l'action des asparagine synthétases (AS), enzymes toutes deux codées par des familles multigéniques. Les connaissances sur ces deux acteurs clés de la remobilisation des composés azotés seront développées au sein du chapitre III de cette introduction. Toutefois, il est intéressant de noter que des loci de caractères quantitatifs (QTL pour Quantitative Trait Locus) pour l'activité GS co-localisent avec des QTL pour des caractéristiques agronomiques chez le maïs et le riz (Hirel et al., 2001; Obara et al., 2004). Ainsi, ces gènes pourraient potentiellement être impliqués dans l'obtention des caractéristiques agronomiques d'intérêt *via* leurs rôles dans la remobilisation, composante de l'utilisation de l'azote au niveau de la plante entière.

9) Relations phylogénétiques entre *Arabidopsis* et le colza

La famille des Brassicacées comprend la plante modèle *Arabidopsis thaliana* ainsi que les plantes du genre *Brassica* dont font partie *Brassica rapa* et *Brassica oleraceae*. Ces deux espèces proches sont à l'origine d'un croisement interspécifique dont le produit est le colza (*Brassica napus*). Le séquençage du génome d'*Arabidopsis* (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) et ceux, plus récents, des génomes des membres du genre *Brassica* (Wang et al., 2011; Chalhoub et al., 2014; Liu

Figure I-9. Duplications récurrentes chez *B. napus*. Alignements génomiques entre l'angiosperme basale *Amborella trichopoda*, l'eudicotylédone basale *Vitis vinifera*, et la crucifère modèle *A. thaliana*. *B. rapa*, *B. oleracea*, et *B. napus* sont également indiquées. Une région ancestrale typique dans *Amborella* devrait correspondre à 72 régions dans *B. napus*. Les bandes grises soulignent les blocs de synténie contenant plus de 10 paires de gènes conservés. (d'après la Figure 1 de Chalhoub et al, 2014).

et al., 2014; Parkin et al., 2014) permet d'analyser les différents événements de duplication génomique s'étant produits au cours de l'histoire évolutive qui a mené à la formation de *Brassica napus* (Chalhoub et al., 2014 ; Figure I-9). Ainsi, une première triplication complète du génome a eu lieu entre l'angiosperme basal *Amborella trichopoda* et l'eudicot basal *Vitis vinifera*. Cet événement baptisé γ est ainsi partagé par la majorité des dicotylédones. Deux événements distincts de duplication complète du génome (β et α) se sont produits avant l'apparition d'*Arabidopsis* faisant de cette espèce un paléopolyploïde. De plus, les membres du genre *Brassica* ont subi une triplication complète du génome supplémentaire peu de temps après leur divergence d'avec *Arabidopsis* (Parkin et al., 2005). Enfin, des espèces de *Brassica* se sont combinées afin de former le colza, *Brassica napus* (Nagaharu U, 1935). Ainsi, au total, le génome de *Brassica napus* représente 72 fois celui des angiospermes d'origine. De nombreuses régions synténiques ayant été identifiées entre *Arabidopsis thaliana* et *Brassica napus*, la découverte de gènes orthologues pourra être facilitée (Parkin et al., 2005; Chalhoub et al., 2014).

A ce jour, des exemples de biologie translationnelle entre ces deux espèces concernent l'identification des enzymes et régulateurs impliqués dans le métabolisme des phénylpropanoïdes dont la connaissance est importante pour la qualité nutritionnelle des graines de colza, la teneur en plusieurs de ces composés (comme l'acide sinapique ou les flavonoïdes) étant l'un des déterminants de ce trait (Auger et al., 2010; Mittasch et al., 2013) ; la modulation de la sénescence (Bieker et al., 2012) ; ou encore l'étude de la voie de signalisation relative à la floraison (Wang et al., 2009). Une voie intéressante de transfert potentiel de connaissances concerne les mécanismes ayant trait à la méiose au vu du rôle important qu'ils pourraient jouer dans l'amélioration et la sélection variétale. La modulation du nombre de cross-over pourrait permettre la création plus rapide et plus aisée de nouvelles variétés (Crismani et al., 2012) et l'introduction, dans une plante cultivée comme *Brassica napus*, de l'apomixie serait d'une grande importance car permettrait la propagation de génotypes élites par graines et à l'identique (d'Erfurth et al., 2009).

Du fait de la publication récente du génome de *Brassica napus*, les tentatives de transfert de connaissances devraient prendre leur essor, notamment afin d'améliorer diverses caractéristiques comme le rendement, la NUE ou encore les qualités nutritionnelles.

II Métabolisme de l'azote chez les plantes

L'azote (N) est l'un des principaux éléments composant la matière organique, ce qui en fait l'un des nutriments les plus importants. Sa disponibilité détermine la croissance et le développement des plantes et conditionne le rendement des cultures agricoles. Il existe une variabilité dans la demande en azote chez les plantes car certaines peuvent acquérir cet élément grâce à la mise en place d'interactions symbiotiques avec des microorganismes du sol comme c'est le cas chez les Fabacées qui interagissent avec des bactéries du genre *Rhizobium* afin de fixer le diazote atmosphérique. Ce type d'interaction est cependant limité à un petit nombre d'espèces végétales, les autres étant tributaires de la disponibilité en azote du sol. L'azote prélevé dans le sol est majoritairement sous forme de nitrate et d'ammonium, plus rarement sous forme d'acides aminés. Cependant, la quantité d'azote dans le sol est souvent relativement faible. Afin d'assurer les rendements et la qualité des cultures, l'agriculture moderne se base donc sur l'utilisation d'engrais azotés qui est de plus en plus décriée au vu du coût économique et des dégâts environnementaux qui sont associés. La connaissance des différents mécanismes intervenant dans le métabolisme de l'azote chez les plantes est donc d'une grande importance.

L'ammonium est la molécule la plus importante du métabolisme azoté car elle est celle qui sert d'intermédiaire réactionnel à la synthèse des autres composés azotés. L'ammonium est également un composé toxique qui ne doit pas s'accumuler dans les cellules car il provoque, entre autres, une réduction de la croissance, une chlorose et une diminution du rendement (Britto and Kronzucker, 2002). L'ammonium peut avoir différentes origines : il peut être (i) absorbé à partir du sol par les racines, (ii) le produit de la réduction du nitrate, (iii) un produit formé au cours de la photorespiration, (iv) provenir du catabolisme des composés azotés et, chez les Fabacées, être produit par le bactéroïde et délivré à la plante par les nodosités.

1) Les sources d'ammonium chez les plantes

1.1) Absorption racinaire de l'ammonium

L'absorption racinaire de l'ammonium se fait grâce à des transporteurs spécifiques codés par les gènes *AMT* (AMmonium Transporter) (von Wiren et al., 2000). Chez *Arabidopsis*, 6 gènes ont pu être identifiés, 5 gènes *AMT1* et un gène *AMT2* mais les nombres de membres par famille peuvent varier selon les espèces (von Wittgenstein et al., 2014). Les différents transporteurs possèdent des affinités pour l'ammonium différentes, des localisations spécifiques et une réponse à la disponibilité en azote (locale ou à l'échelle de la plante entière) également spécifique (Loque and von Wiren, 2004). Lorsque les concentrations du sol en nitrate et ammonium sont équivalentes et faibles, les plantes utilisent préférentiellement l'ammonium (Gazzarrini et al., 1999). Cependant, le nitrate est

Figure II-1. Les transporteurs de nitrate chez Arabidopsis. Contribution des familles NRT1, NRT2, et des protéines chloride channel (CLC) a/b et slow anion channel-associated 1 homolog 3 (SLAH3) à différentes étapes de l'absorption et de l'allocation du nitrate. Le nitrate est absorbé par les racines à partir du sol et transporté vers les parties aériennes et les graines pour son stockage et/ou son assimilation. Abréviations : HATS, système de transport à haute affinité ; LATS, système de transport à faible affinité.

en général présent en plus grande proportion dans le sol par rapport à l'ammonium (de 10 à 1000 fois plus ; (von Wiren et al., 2000)).

1.2) Absorption racinaire du nitrate et réduction en ammonium

1.2.1) Absorption du nitrate par les racines

L'absorption racinaire de nitrate comprend deux systèmes faisant intervenir des transporteurs distincts (Figure II-1) :

- lorsque la concentration en nitrate dans le sol est élevée (supérieure à 0,5 mM), les transporteurs de l'ancienne famille *NRT1* (maintenant appartenant à la famille *NPF*, (Leran et al., 2014)) sont responsables du transport à faible affinité (LATS pour Low Affinity Transport System). Chez *Arabidopsis*, cette famille comporte 53 membres parmi lesquels 16 ont montré une activité de transport de nitrate (Krapp et al., 2014; Leran et al., 2014). Le gène le plus étudié de cette famille, le gène *NRT1.1*, possède une double affinité pour le nitrate et agit comme un senseur du nitrate (Liu and Tsay, 2003).

- lorsque les concentrations en nitrate dans le sol sont faibles (inférieures à 200 μ M), les transporteurs de la famille *NRT2* (7 membres chez *Arabidopsis*) sont responsables du transport à haute affinité du nitrate (HATS pour High Affinity Transport System) (Orsel et al., 2002). Ce système comprend une composante constitutive (cHATS) qui s'exprime de façon basale même quand la plante n'est pas en présence de nitrate ainsi qu'une composante inducible (iHATS) qui se met en place lorsque la fourniture d'azote à la plante se fait sous forme de nitrate. L'étude des différents membres de la famille *NRT2* a montré que les gènes *NRT2.1*, *NRT2.2* et *NRT2.4* sont plus particulièrement impliqués dans l'absorption du nitrate au niveau des racines (Filleur et al., 2001; Kiba et al., 2012). Les autres gènes *NRT2* seraient plutôt impliqués dans le transport de nitrate au sein de la plante (Krapp et al., 2014).

Il est à noter que deux autres familles de protéines ont été montrées comme capables de transporter du nitrate : il s'agit des familles SLAC/SLAH (slow-type anion channels et slow-type anion channels homologues) et CLC (Chloride Channel). Toutefois, aucune activité d'absorption racinaire n'est connue à ce jour pour les membres de ces familles (Krapp et al., 2014).

1.2.2) Réduction du nitrate en ammonium

À la suite de son absorption au niveau des racines, le nitrate peut être stocké dans la vacuole ou bien réduit en ammonium qui pourra ensuite être assimilé. La première étape de la réduction du nitrate en ammonium est effectuée par l'action de la nitrate réductase à NADH ou NADPH (NR,

NADH-NR : EC 1.6.6.1 ; NADPH-NR : EC 1.6.6.3), au niveau racinaire ou dans les feuilles après transport de l'ammonium par le xylème. Cette enzyme cytosolique permet la formation de nitrite grâce à une holoenzyme homodimérique au sein de laquelle chaque monomère s'associe avec trois cofacteurs différents (la Flavine Adénine Dinucléotide (FAD), un hème et un cofacteur à molybdène (MoCo)). Chez *Arabidopsis*, cette enzyme est codée par deux gènes, *NIA1* et *NIA2*, s'exprimant respectivement au niveau racinaire et foliaire, et dont la double mutation entraîne une accumulation de nitrate dans la plante et des problèmes de croissance (Wilkinson and Crawford, 1993). Le nitrite formé par l'action de la NR étant toxique pour la plante, il est transporté dans les chloroplastes afin d'être réduit en ammonium par l'action de la nitrite réductase (NiR), enzyme qui utilise la ferrédoxine réduite comme cofacteur (Fd-NiR : EC 1.7.7.1) (Meyer and Stitt, 2001).

1.3) La photorespiration

Les processus d'absorption de nitrate et d'ammonium au niveau racinaire sont d'une grande importance pour l'acquisition primaire d'azote par la plante. Cependant, ces processus ne constituent pas la principale voie de formation d'ammonium au sein de la plante. En effet, la photorespiration relargue de forte quantité d'ammonium (jusqu'à dix fois plus que l'assimilation primaire) qui doit impérativement être réassimilé sous peine de se révéler toxique pour la plante. La photorespiration est un mécanisme qui se produit principalement dans les plantes à métabolisme de type C3 du fait de l'absence de compartimentation entre la capture du CO₂ et sa fixation (Moroney et al., 2013). La ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (RuBisCO) possède une double affinité pour le dioxyde de carbone (CO₂) et pour le dioxygène (O₂). L'activité carboxylase permet la formation de 3-phosphoglycérate (3-PGA) à partir de ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) et de CO₂, permettant ainsi la transformation de ce dernier en composés organiques. Le RuBP est ensuite régénéré grâce au cycle de Calvin afin que l'assimilation de carbone puisse se poursuivre. En raison de la double affinité de la RuBisCO pour le CO₂ mais aussi pour l'O₂, l'activité oxygénase de l'enzyme peut également aboutir à la formation d'un co-produit indésirable, le 2-phosphoglycolate qui n'est pas directement métabolisable et est donc régénéré en RuBP *via* le cycle photorespiratoire. Ce cycle fait intervenir une dizaine d'enzymes différentes dans trois compartiments sub-cellulaires distincts : le chloroplaste, le peroxysome et la mitochondrie. Le 2-phosphoglycolate est dans un premier temps transformé en glycolate par la phosphoglycolate phosphatase (EC 3.1.3.18), lui-même transformé en glyoxylate par la glycolate oxydase (EC 1.1.3.15) au sein du peroxysome. Le glyoxylate est ensuite transaminé, grâce au glutamate ou à la sérine, en glycine par la glycine transaminase (EC 2.6.1.4) ou la sérine-glyoxylate transaminase (EC 2.6.1.45), respectivement. La glycine est alors importée dans la mitochondrie où elle est transformée en sérine par l'action du système de clivage de la glycine (EC 1.4.4.2/EC 2.1.2.10/EC 1.8.1.4) et de la sérine hydroxyméthyltransférase (EC 2.1.2.1). L'ensemble de

Figure II-2. La photorespiration a lieu dans plusieurs compartiments cellulaires et possède des liens avec les métabolismes de l'azote et du carbone. CAT, catalase ; ComplexI, NADH:ubiquinone reductase of the mitochondrial electron transport chain ; GDC, glycine decarboxylase ; GLYK, glycerate 3-kinase ; GOGAT, ferredoxin-dependent glutamate synthase ; GOX, glycolate oxidase ; GGT, glutamate:glyoxylate aminotransferase ; GS, glutamine synthetase ; HPR1, peroxisomal hydroxypyruvate reductase ; HPR2, cytosolic hydroxypyruvate reductase ; MDH, malate dehydrogenase ; NDAin, internal NADH:ubiquinone reductase ; PGP, 2PG phosphatase ; SGT, serine:glyoxylate aminotransferase ; and SHMT, serine hydroxymethyltransferase.

ces réactions mitochondriales permet, à partir de deux glycines, la production d'une molécule de sérine au prix de la production d'ammonium, de CO₂ et de NADH. Cette sérine permet la production de 3-PGA qui peut rejoindre le cycle de Calvin après l'action de la sérine-glyoxylate transaminase (EC 2.6.1.45) et de l'hydroxypyruvate réductase (EC 1.1.1.81) dans le peroxyssome puis de la glycérate kinase (EC 2.7.1.31) dans le chloroplaste (Figure II-2).

1.4) Le catabolisme des composés azotés, source d'ammonium

1.4.1) Sénescence et remobilisation des nutriments

Le catabolisme des composés azotés qui composent la cellule est une source importante d'ammonium au sein de la plante. En effet, il permet la réutilisation de l'azote déjà présent dans la plante au niveau d'organes sources afin de permettre le développement d'organes puits. Cette réutilisation se fait principalement à partir des feuilles lors de la sénescence. La sénescence séquentielle permet le recyclage des nutriments à partir des feuilles âgées vers les nouvelles feuilles en formation. La sénescence monocarpique correspond à l'entrée en sénescence de l'ensemble de la plante afin que les nutriments puissent être remobilisés vers les graines en formation. La sénescence foliaire est la dernière phase du développement de la feuille, conduisant à sa mort programmée. Cependant, cette phase est aussi longue que la phase de maturation et fait intervenir un ensemble d'évènements coordonnés permettant la dégradation contrôlée et le recyclage des composés présents dans la feuille. Un certain nombre d'approches « -omiques » a permis l'identification de gènes associés à la sénescence (gènes SAG pour Senescence Associated Genes) ainsi que de molécules (protéines et métabolites notamment) marqueurs de ce processus (Wilson et al., 2002; Guo et al., 2004; Watanabe et al., 2013). Les gènes SAG peuvent être classés en différents groupes en fonction de leur profil d'expression temporel. En effet, certains vont être exprimés au début du processus de sénescence tandis que d'autres vont l'être vers la fin de ce même processus ou bien tout au long de celui-ci. Les gènes SAG ont des fonctions diverses telles que des facteurs de transcription, des gènes impliqués dans la dégradation des protéines, de la chlorophylle et des acides nucléiques, des gènes du métabolisme des acides aminés et des carbohydrates, des gènes impliqués dans la signalisation hormonale ou encore dans l'autophagie et le transport (Guo, 2013).

1.4.2) Protéolyse et remobilisation de l'azote

La principale source d'azote au sein des feuilles est le chloroplaste qui renferme près de 70% des protéines cellulaires. Parmi celles-ci, la RuBisCO et les autres protéines impliquées dans la photosynthèse en sont la majeure partie. La dégradation de la RuBisCO serait initiée par l'augmentation de la quantité d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour Reactive Oxygen Species)

dans le chloroplaste, dégradant partiellement l'enzyme qui est alors fragmentée et oxydée. La protéolyse qui se fait sans doute essentiellement dans la vacuole centrale fait également intervenir des phénomènes spécifiques de la sénescence comme le souligne l'apparition de vacuole spécifique de la sénescence, siège de l'activité cystéine protéase de la protéine SAG12 ainsi que des processus normalement impliqués dans le maintien de l'homéostasie (dégradation par le protéasome, autophagie). Les acteurs de la dégradation des protéines chloroplastiques lors de la sénescence et notamment le rôle de l'autophagie dans la remobilisation des nutriments lors de la sénescence a fait l'objet d'une revue par notre équipe à laquelle j'ai pris part et qui figure en annexe (Avila-Ospina et al., 2014). De plus, il est intéressant de noter que la disponibilité en azote dans le milieu de culture a une influence sur la remobilisation de l'azote au sein de la plante et influence ainsi sur la qualité des graines. En effet, il a été montré que la limitation chronique en azote favorise le recyclage et la remobilisation chez *Arabidopsis thaliana* (Lemaître et al, 2008). La dégradation massive de protéines aboutit à une importante libération d'acides aminés et d'ammonium dans la cellule qui doit être réassimilé afin d'éviter un effet toxique et afin de permettre le transport de l'azote vers les puits. Les mécanismes assurant l'assimilation et le recyclage de l'ammonium par la plante sont donc de première importance.

2) Le cycle GS/GOGAT, principale voie d'assimilation de l'ammonium

14

Du fait de sa toxicité, l'ammonium est rapidement pris en charge et assimilé par différentes voies métaboliques. En effet, il permet la synthèse des autres composés azotés : acides aminés, par conséquent protéines, et acides nucléiques. L'assimilation de l'ammonium (assimilation primaire après absorption racinaire et réduction des nitrates ou réassimilation de l'ammonium photorespiratoire) est principalement effectuée par l'action de deux enzymes : la glutamine synthétase (GS ; EC 6.3.1.2) et la glutamate synthase (glutamate oxoglutarate amino transférase ; GOGAT ; Fd-GOGAT EC 1.4.7.1 ; NADH-GOGAT EC 1.4.1.14) dont l'action successive forme le cycle majeur du métabolisme de l'azote, le cycle GS/GOGAT. La GS est responsable de l'incorporation d'une molécule d'ammonium sur le glutamate aboutissant à la formation de la glutamine qui est prise en charge par la GOGAT qui catalyse le transfert du groupement amide de la glutamine sur l' α -cétooglutarate pour former deux molécules de glutamate. L'une des molécules de glutamate va pouvoir continuer de faire tourner le cycle alors que la deuxième va servir à la synthèse des autres acides aminés et molécules azotées *via*, notamment, des transaminations (Coruzzi, 2003).

2.1) La Glutamine Synthétase

La GS comprend deux classes d'isoenzymes distinctes définies en fonction de leur profils électrophorétiques et de leurs localisations sub-cellulaires spécifiques : la GS1 (isoenzyme

cytosolique) et la GS2 (isoenzyme chloroplastique). Les connaissances sur les GS seront plus particulièrement traitées dans le chapitre III de cette introduction. Brièvement, il semble que le rôle principal de la GS2 soit la réassimilation de l'ammonium photorespiratoire. En effet, des mutants nuls pour la GS2 chez l'orge ne survivent pas lorsqu'ils sont cultivés dans des conditions photorespiratoires (i.e. sous atmosphère normale) alors qu'ils se développent correctement lorsque la photorespiration est inhibée (i.e. lorsque les plantes sont cultivées sous fort CO₂) (Wallsgrave et al., 1987). La GS1 serait impliquée dans l'assimilation primaire au niveau des racines et dans la réassimilation de l'ammonium produit lors du catabolisme des composés azotés.

2.2) La glutamate synthase

Deux formes de GOGAT existent selon la nature du cofacteur (Ferrédoxine réduite (Fd) ou NADH) et ces deux formes sont retrouvées dans le chloroplaste. Cependant, dans les organes photosynthétiques, l'essentiel de l'activité GOGAT (95%) est médié par la Fd-GOGAT dont le rôle serait coordonné à celui de la GS dans l'assimilation primaire de l'ammonium et la réassimilation de l'ammonium photorespiratoire. En effet, des mutants Fd-GOGAT présentent le même phénotype photorespiratoire que les mutants *gln2* d'orge décrits ci-dessus (Coschigano et al., 1998). La NADH-GOGAT est majoritairement exprimée dans les racines et les tissus vasculaires et joue un rôle dans l'assimilation primaire d'ammonium dans des conditions non photorespiratoires (Lancien et al., 2002).

15

3) Transport de l'azote au sein de la plante lors de la remobilisation des composés azotés

3.1) Voies et formes de transport

Le transport des composés azotés dans la plante, des organes sources vers les organes puits, se fait par l'intermédiaire du phloème dont le chargement intervient au niveau des veines mineures (Haritatos et al., 2000a; Haritatos et al., 2000b) alors que le déchargement interviendrait plutôt au niveau des veines majeures (primaires et secondaires notamment ; Imlau et al., 1999)). L'analyse de la composition de la sève phloémienne chez plusieurs espèces végétales, comme *Arabidopsis* ou le colza, a montré que le glutamate, l'aspartate et leurs amides respectifs, la glutamine et l'asparagine sont les acides aminés préférentiellement utilisés pour le transport de l'azote (Hunt et al., 2010a; Lohaus and Schwerdtfeger, 2014). Lors de la sénescence, la concentration en acides aminés dans la sève phloémienne reste élevée (Tilsner et al., 2005) et la concentration en glutamine et asparagine y augmente (Feller and Fischer, 1994). Ainsi, ces deux acides aminés, la glutamine et l'asparagine sont de première importance dans les mécanismes de transport de l'azote au cours de la sénescence, étape du développement au cours de laquelle se produit la remobilisation de l'azote des sources vers

les puits. Les enzymes responsables de la synthèse de ces deux acides aminés, les glutamine synthétases et les asparagine synthétases, seront donc décrites dans le chapitre III de cette introduction. De plus, un certain nombre de transporteurs de composés azotés (acides aminés et peptides) sont induits au cours de la sénescence et participeraient ainsi au transport et à la remobilisation de l'azote (Masclaux-Daubresse et al., 2008).

3.2) Les transporteurs d'acides aminés et de peptides

Plusieurs revues (Rentsch et al., 2007; Tegeder and Rentsch, 2010; Tegeder, 2014) résument les connaissances actuelles concernant les transporteurs d'acides aminés et de peptides. Chez *Arabidopsis*, les transporteurs d'acides aminés appartiennent à cinq familles de gènes différentes :

- La famille de transporteurs d'acides aminés (ATF pour Amino acid Transporter Family ou AAAP pour Amino Acid/Auxin Permease). Cette famille est la plus étudiée et comprend 6 sous-familles. La sous-famille des AAP (pour Amino Acid Permease) transporte des acides aminés neutres et le glutamate, celle des LHT (pour Lysine Histidine Transporter) transporte des acides aminés neutres, acides et la lysine et l'histidine, la proline est transportée par la sous-famille ProT (pour Proline Transporter), l'acide γ -aminobutyrique (GABA) et les composés proches par les membres de la sous-famille GAT (pour GABA Transporter). Enfin, la sous-famille ANT (pour Aromatic Neutral amino acid Transporter) permet le transport des acides aminés neutres et aromatiques.

- La famille APC (pour Amino acid Polyamine Choline) : au sein de cette famille, la sous-famille CAT (pour Cationic Amino acid Transporter) transporte des acides aminés neutres.

- La famille OEP16 ou PRAT (pour plastid Outer Envelope Porin of 16kDa ou PReprotein and Amino acid Transport) transporte la protéine OEP16 chez le pois et divers acides aminés et amines.

- La famille des transporteurs mitochondriaux (MCF pour Mitochondrial Carrier Family) prend notamment en charge l'arginine, la lysine, l'ornithine et l'histidine au niveau de la mitochondrie.

- Enfin, la famille des symports anion divalent/sodium (DASS pour Divalent Anion Sodium Symporter) permet l'échange entre le glutamate et le malate au niveau des chloroplastes.

Les peptides sont principalement transportés par les membres de trois familles : la famille PTR/NRT1 (pour Peptide Transporter/Nitrate transporter 1) prend en charge les di- et tri-peptides alors que la famille OPT (pour OligoPeptide Transporter) prend en charge les tétra- et penta-peptides ainsi que le glutathion. Enfin, les peptides de plus grande taille seraient transportés grâce aux membres de la famille ABC (pour ATP Binding Cassette).

Ces transporteurs permettent l'absorption des nutriments et leur répartition entre les organes sources et les organes puits. Les différentes familles et sous-familles décrites ci-dessus existent en raison de la gamme de composés azotés qui circulent au sein de la plante et des différents types de

cellules présents dans les plantes. Ainsi, chaque famille de transporteur (voire chaque membre d'une même famille) présente une sélectivité et / ou une affinité spécifique.

Figure III-1. Structure de la GS1a de maïs (Figure 2 d'Unno et al, 2006). a. Structure globale, vue du dessus. b. Structure globale, vue de côté. Les sites actifs, situés à l'interface entre deux sous-unités, sont indiqués par des flèches sur l'anneau pentamérique supérieur.

Figure III-2. Profil électrophorétique des glutamine synthétase par la technique de Western Blot. (d'après Figure 5 de Masclaux-Daubresse et al, 2000).

III GS et AS, acteurs clés de l'assimilation de l'ammonium

1) Glutamine Synthétases

1.1) Réaction catalysée et structure quaternaire



Les glutamine synthétases (GS) sont des enzymes qui catalysent la condensation, ATP-dépendante, d'une molécule d'ammonium sur une molécule de glutamate permettant la formation de glutamine (voir équation ci-dessus). La superfamille des GS est composée de trois classes différentes (GSI, II et III) se caractérisant par des poids moléculaires différents et un nombre de sous-unités par holoenzyme variable selon les classes. Les GS de type I et celles de type II sont prévalentes chez les procaryotes et chez les eucaryotes respectivement. Cependant, chacun de ces types est trouvé chez les deux catégories d'organismes (Swarbreck et al., 2011).

La structure cristallographique des GSII de plantes a été étudiée chez le maïs pour les monocotylédones (Unno et al., 2006) et chez *Medicago truncatula* pour les dicotylédones (Seabra et al., 2009). Ces études ont montré que ces enzymes s'organisent en décamères ; 2 anneaux de 5 sous-unités s'associent et un site catalytique se forme à l'interface entre deux sous-unités (Figure III-1). Cette structure quaternaire diffère de celle des GS de type I et III pour lesquelles l'étude des GS de type I (Almassy et al., 1986; Krajewski et al., 2005) et de type III (van Rooyen et al., 2011) issues de bactéries a révélé une structure dodécamérique associant deux anneaux de six sous-unités chacun.

18

1.2) La glutamine synthétase chez les plantes

Chez les plantes supérieures, les GSII étant responsables de la majorité de l'activité GS mesurée, seules celles-ci sont traitées dans le manuscrit (ainsi, l'appellation GS désigne les GSII). On distingue deux isoenzymes distinctes se différenciant au niveau de leurs profils électrophorétiques : une isoenzyme chloroplastique, la GS2 (40 kDa) et une isoenzyme cytosolique, la GS1 (38 kDa) (Figure III-2). Une publication récente (Dragicevic et al., 2014) a montré que différentes isoformes de GS1 d'*Arabidopsis* peuvent former des homodécamères, ou bien s'associer entre elles pour former des hétérodécamères. Ainsi, une mutation dans l'un des cinq gènes *GLN1*, codant les isoformes cytosoliques, n'empêche pas la formation d'un décamère fonctionnel car les isoformes non mutées s'associent en un assemblage de sous-unités différent (Dragicevic et al., 2014). Les deux isoenzymes auraient un rôle dans des étapes différentes du métabolisme azoté expliquant leur compartimentation sub-cellulaire. En effet, la GS2 serait exprimée au niveau des feuilles, notamment pour l'assimilation primaire d'ammonium (NH_4^+) mais surtout pour permettre la réassimilation de l'ammonium provenant de la photorespiration alors que l'isoenzyme cytosolique présenterait une

Figure III-3. Principales voies du métabolisme azoté dans les cellules des feuilles jeunes (gauche) et des feuilles sénescentes (droite). GDH, glutamate déshydrogénase ; GAD, glutamate décarboxylase ; GS1, glutamine synthétase cytosolique ; GS2, glutamine synthétase chloroplastique ; GLN, glutamine ; GLU, glutamate, ASN, asparagine ; Gaba, acide γ -aminobutyrique ; 2-OG, α -cétooglutarate ; NO_3^- , nitrate ; NH_4^+ , ammonium. (d'après Figure 2 de Masclaux-Daubresse et al, 2008).

<u>Gène</u>	<u>Numéro d'accension</u>	<u>Isoforme</u>
<i>AtGLN2</i>	At5g35630	chloroplastique
<i>AtGLN1;1</i>	At5g37600	cytosolique
<i>AtGLN1;2</i>	At1g66200	cytosolique
<i>AtGLN1;3</i>	At3g17820	cytosolique
<i>AtGLN1;4</i>	At5g16570	cytosolique
<i>AtGLN1;5</i>	At1g48470	cytosolique

Tableau III-1. Gènes *GLN* d'*Arabidopsis thaliana*.

expression dans les racines afin de participer à l'assimilation primaire de NH_4^+ (absorption et réduction du nitrate) et la production de glutamine pour la translocation vers l'ensemble des organes de la plante. De plus, son expression augmente dans les feuilles sénescentes pour compenser l'activité GS2 qui décroît du fait de la dégradation des chloroplastes, et donc de la disparition progressive de l'isoenzyme chloroplastique, au cours de la sénescence foliaire (Figure III-3). L'isoenzyme cytosolique apparaît donc comme étant de première importance pour les processus de recyclage et de remobilisation de l'azote des feuilles sénescentes vers les puits en formation.

1.2.1) Étude des glutamine synthétases cytosoliques chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*

Chez la plupart des plantes supérieures, la GS2 est codée par un gène unique alors que la GS1 est en général codée par une famille multigénique comprenant entre 2 et 5 membres (Cren and Hirel, 1999). Chez *Arabidopsis*, l'isoforme chloroplastique est codée par le gène *GLN2* et l'isoforme cytosolique par cinq gènes, les gènes *GLN1* (Tableau III-1). Les données d'expression, issues d'études transcriptomiques, et disponibles grâce au site eFP Browser ((Winter et al., 2007); <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) montrent que le gène *GLN2* s'exprime majoritairement au niveau des tissus photosynthétiques et que cette expression diminue avec l'âge. Le gène *AtGLN1;1* est décrit comme étant induit dans les tissus âgés ; le gène *AtGLN1;2* comme ayant un niveau d'expression relativement constant avec toutefois une légère induction au cours du vieillissement ; *AtGLN1;3* est plutôt exprimé au niveau des tissus reproducteurs ; *AtGLN1;4* comme étant exprimé à un faible niveau sauf au niveau des feuilles caulines et des feuilles sénescentes ; enfin *AtGLN1;5* est exprimé spécifiquement au niveau des graines. L'induction des gènes *GLN1;1*, *GLN1;2* et *GLN1;4* au cours du vieillissement foliaire est confirmé par l'analyse du transcriptome des feuilles sénescentes (Guo et al., 2004).

Ishiyama et al (2004b) ont déterminé les spécificités d'expression de chacun des gènes *GLN1* au niveau de la racine chez *Arabidopsis* grâce à l'utilisation de fusions transcriptionnelles associant les promoteurs des gènes d'intérêt avec la séquence codant la GFP. Ils ont ainsi montré que le gène *GLN1;1* s'exprime à la surface de la racine, au niveau de l'épiderme, des poils absorbants et de la pointe racinaire. Les gènes *GLN1;2*, *GLN1;3* et *GLN1;4* sont, quant à eux, plutôt exprimés au niveau du tissu vasculaire, plus précisément dans le péricycle : tout au long de la racine, au niveau de la zone mature ou bien uniquement au niveau de la zone d'émergence des racines latérales, respectivement (Figure III-4). La production de protéines recombinantes en système hétérologue chez *Escherichia coli* par ce même groupe a permis d'étudier les propriétés cinétiques des différentes isoformes *GLN1* (Ishiyama et al., 2004b). Les isoformes *GLN1;1* et *GLN1;4* présentent un K_m faible, et donc une forte

Figure III-4. Spécificité de l'expression des gènes *GLN1* d'Arabidopsis au niveau racinaire. La localisation est déterminée par l'emploi de fusions promoteur-GFP. (A, B) *ProGLN1;1:GFP*. (C-E) *ProGLN1;2:GFP*. (F-H) *ProGLN1;3:GFP*. (I, J) *ProGLN1;4:GFP*. La fluorescence a été observée au niveau de la zone mature (C, F et I), de la zone de différenciation des poils racinaires (A, D et G) et de la pointe racinaire (B, E, H et J) grâce à un microscope confocal. ep : cellule épidermale. pe : pericycle. rh : poil racinaire. Échelle : 100 µm. (d'après Figure 7 d'Ishiyama et al, 2004).

affinité, pour le glutamate et l'ammonium. A l'inverse, les isoformes GLN1;2 et GLN1;3 présentent un fort K_m , et donc une faible affinité, pour ces deux composés. Il a pu être mis en évidence que deux acides aminés sont précisément responsables de l'efficacité catalytique des GS chez les plantes (Ishiyama et al., 2006). En effet, une glutamine en position 49 et une sérine en position 174 sont retrouvés dans la séquence des isoformes d'*Arabidopsis* présentant une activité GS à forte affinité (GLN1;1 et GLN1;4). De plus, au moins l'un de ces acides aminés est retrouvé chez le riz dans la séquence des isoformes à forte affinité GLN1;1 et GLN1;2.

A partir de l'ensemble des données décrites ci-dessus (localisation dans différents tissus ou organes, régulations spécifiques et propriétés cinétiques différentes), il a été présumé que les différentes isoformes ne doivent pas avoir de fonctions redondantes dans la physiologie de la plante. L'étude du gène *AtGLN1;2* a été entreprise au laboratoire (Lothier et al., 2011) en se basant sur le fait qu'il est le gène dont l'expression est la plus fortement détectée au niveau des feuilles de rosette d'*Arabidopsis* et de façon plus prononcée sous fort azote (en accord avec les données d'affinité publiées par Ishiyama en 2004). Un ensemble de techniques de biologie moléculaire et cellulaire, de biochimie et d'approches physiologiques a été mis en œuvre afin de déterminer la fonction de ce gène chez *Arabidopsis*. Une diminution du contenu protéique en GS1 a été observée chez le mutant, par rapport au WT, mais seulement sous fort azote. Il a également été observé une diminution de l'activité GS globale de plus de 50% chez le mutant, ainsi qu'une diminution de la GS1 entre 10mM et 2mM, et ceci même chez le sauvage. De plus, le mutant présente une biomasse moins importante en condition non-limitante bien que ce retard soit rattrapé en fin de cycle. De façon intéressante, l'expression du promoteur se fait principalement dans les veines tertiaires et quaternaires, lieu de chargement des acides aminés et des sucres dans le phloème. L'expression des transporteurs d'acides aminés réalisant le chargement du phloème pourrait, chez ce mutant, varier par rapport à ce qu'elle est chez une plante sauvage. En accord avec la localisation de l'activité du promoteur du gène *AtGLN1;2*, la protéine codée a été localisée au niveau des cellules compagnes du phloème. Il n'a pas été observé de modifications du poids du grain ou de modification du rendement chez le mutant, soulignant un rôle du gène *AtGLN1;2* uniquement au stade végétatif. Ainsi, le mutant présente des problèmes dans l'assimilation de l'ammonium produit tout au long du développement végétatif de la rosette. Le gène *AtGLN1;2* a donc été montré comme étant impliqué dans le métabolisme de l'ammonium au niveau de la rosette sous fort azote. Une telle étude fonctionnelle était alors nécessaire pour les gènes *GLN1* codant les autres isoformes présentes chez *Arabidopsis*.

Figure III-5. Phénotype des épis des mutants de maïs déficients en GS1. Épis du sauvage (WT), des mutants simples *gln1-3* et *gln1-4* et du double mutant *gln1-3/gln1-4* récoltés à maturité sur des plantes cultivées sous fort azote. (d'après la Figure 11 de Martin et al, 2006).

1.2.2) Étude du rôle des glutamine synthétases cytosoliques chez les plantes d'intérêt agronomique

Outre chez *Arabidopsis*, les GS1 sont également étudiées chez plusieurs plantes cultivées comme le riz, le blé ou le maïs pour les monocotylédones ou encore le colza pour les dicotylédones. Des analyses phylogénétiques ont montré une dichotomie entre les séquences de monocotylédones et celles des dicotylédones, les données et résultats obtenus sont donc difficilement transférables d'une espèce à l'autre entre ces deux groupes (Lothier et al., 2011). Chez le riz, trois gènes codent des GS cytosoliques, *OsGS1;1*, *OsGS1;2* et *OsGS1;3*. Le gène *OsGS1;1* est exprimé au niveau de la plante entière et, plus particulièrement au niveau des feuilles au stade végétatif (Tabuchi et al., 2005). La protéine *OsGS1;1* est localisée au niveau des cellules compagnes et du parenchyme foliaire (Tabuchi et al., 2007) et présente une forte affinité pour l'ammonium, comme la protéine *OsGS1;2* (Ishiyama et al., 2004a). La mutation du gène *OsGS1;1* conduit à une réduction de la croissance et du remplissage du grain, conséquence probable de la réduction du taux de glutamine destinée à la remobilisation de l'azote *via* le phloème (Tabuchi et al., 2005). Le gène *OsGS1;2* est détecté dans les racines et répond à un traitement à l'ammonium (Ishiyama et al., 2004a). Il code une protéine qui co-localise dans les racines avec un transporteur d'ammonium et une glutamate synthase, soulignant un rôle potentiel de ce gène dans l'assimilation primaire d'ammonium (Tabuchi et al., 2007). Le mutant *Osgs1;2* présente une réduction de la biomasse et du nombre de panicules, résultat d'une réduction drastique de l'assimilation primaire d'ammonium au niveau des racines (Funayama et al., 2013). Enfin, le gène *OsGS1;3* est spécifique des épillets (Tabuchi et al., 2005) et reste, à ce jour, peu caractérisé bien que des résultats préliminaires montrent un retard de sénescence chez les mutants nuls (Yamaya and Kusano, 2014). Chez le maïs, parmi les cinq gènes codant des GS cytosoliques, deux ont plus particulièrement été étudiés, dont le gène *Gln1-4* qui est induit au cours de la sénescence. Les gènes *Gln1-3* et *Gln1-4* sont exprimés dans les feuilles, dans les cellules du mésophylle et de la gaine péri-vasculaire, respectivement. Leur mutation entraîne une baisse de la productivité avec une diminution du nombre et de la taille des grains respectivement (Figure III-5 ; (Martin et al., 2006)). Chez le blé, les GS cytosoliques sont codées par sept gènes différents. Ces gènes s'organisent en trois sous-familles comprenant chacune deux ou trois gènes, du fait de l'hexaploïdie du génome du blé (Bernard et al., 2008b). Les gènes de la sous-famille *GS1* s'expriment dans les tissus situés autour des vaisseaux tandis que ceux de la sous-famille *GSr* s'expriment notamment au niveau des cellules compagnes du phloème. Ces localisations suggèrent un rôle important de ces gènes dans les phénomènes de translocation d'azote au sein de la plante, notamment dans la remobilisation au cours de la sénescence, la quantité de protéine GS1 augmentant dans les feuilles au cours de ce stade de développement. L'expression des gènes de la sous-famille *GSe* étant faible et ne présentant

pas de spécificité tissulaire, il est difficile d'émettre une hypothèse concernant le rôle de cette isoforme. Enfin, une étude récente chez l'orge a détaillé l'expression des trois gènes *GS1* présents chez cette espèce (Goodall et al., 2013). En raison de l'absence d'analyse de génotypes mutants, une fonction précise n'a pu être attribuée à chacun des gènes mais les profils d'expression distincts suggèrent des rôles spécifiques de chacun des gènes dans le métabolisme azoté. Ainsi, le gène *HvGS1_1* s'exprime majoritairement dans les feuilles et les tiges, au niveau des vaisseaux. Il serait impliqué dans la mobilisation de l'azote issu de l'assimilation primaire ou du catabolisme des feuilles sénescences. Le gène *HvGS1_2* s'exprime majoritairement au niveau du cortex racinaire ainsi que dans le mésophylle foliaire. La fonction principale de ce gène serait donc l'assimilation primaire d'ammonium dans les racines. Enfin, le gène *HvGS1_3* est spécifique des graines et jouerait un rôle important dans la maturation de celles-ci en assimilant l'ammonium libre.

Nicotiana tabacum, une des premières espèces utilisées pour l'étude des GS cytosoliques chez les dicotylédones, possède deux gènes *GS1* : *GLN1.3* est principalement exprimé dans les racines et les fleurs et induit dans les feuilles sénescences, tandis que *GLN1.5* est spécifique du phloème. Chez le colza, l'analyse des séquences exprimées dans les racines a permis l'identification de quatre gènes codant des GS cytosoliques (Ochs et al., 1999). De plus, ces gènes sont induits au cours de la sénescence (Buchanan-Wollaston and Ainsworth, 1997) et traduisent la présence, chez le colza, d'isoformes en provenance des deux génomes ancestraux (Ochs et al., 1999).

Ainsi, l'étude des profils d'expression des différents gènes *GS1* chez différentes espèces et l'étude fonctionnelle de certains de ces gènes par génétique inverse a permis d'obtenir des informations sur le rôle des différentes isoformes *GS1* dans le métabolisme de l'azote chez plusieurs espèces de monocotylédones et dicotylédones. En parallèle, l'utilisation d'approches de génétique quantitative a permis de mettre en évidence la co-localisation de loci de caractères quantitatifs (QTL pour Quantitative Trait Loci) impliqués dans la variabilité de traits agronomiques comme le poids de mille grains ou le nombre de grains avec des QTL pour l'activité GS ainsi qu'avec des gènes *GS1* (Hirel et al., 2001; Obara et al., 2004).

1.3) La régulation des glutamine synthétases cytosoliques : un processus à plusieurs niveaux

Au sein d'une même espèce, les profils d'expression non redondants des gènes *GLN1*, suggérant des rôles distincts dans le métabolisme de l'azote au sein de la plante (Ishiyama et al., 2004b; Tabuchi et al., 2005; Lothier et al., 2011; Goodall et al., 2013; Orsel et al., 2014), reposent sur une régulation à plusieurs niveaux : transcriptionnel, post-transcriptionnel et traductionnel (Figure III-6). Le niveau d'ARNm codant des *GS1* est régulé par la lumière, la disponibilité en squelettes

Figure III-6. Vue d'ensemble des mécanismes de régulation des GS1. La régulation intervient au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel, et post-traductionnel. Les métabolites azotés incluent l'ammonium (NH_4^+), le glutamate (Glu) et la glutamine (Gln). Les métabolites carbonés incluent le saccharose et d'autres sucres. Les facteurs de transcription incluent certains des familles MYB et Dof. Les flèches indiquent des régulations positives et les indiquent des régulations négatives. (d'après la Figure 2 de Thomsen et al, 2014).

carbonés et celle en acides aminés (Oliveira and Coruzzi, 1999). Le saccharose et le glutamate induisent l'expression des GS1 (Masclaux-Daubresse et al., 2005) mais le ratio entre glutamate et glutamine semble jouer un rôle important dans la régulation de l'expression des GS1 (Watanabe et al., 1997). De plus, des gènes GS1 répondent à la limitation en azote ou bien à l'ammonium en tant que source d'azote chez plusieurs espèces (Caputo et al., 2009; Goodall et al., 2013). Cette régulation transcriptionnelle fait notamment intervenir des facteurs de transcription des familles MYB et Dof (Gutierrez et al., 2008; Castro-Rodriguez et al., 2011; El-kereamy et al., 2012). La régulation post-transcriptionnelle de l'expression des GS1 est connue chez le soja et est médiée par les régions non transcrites (UTR) en 5' et en 3' des ARNm. En effet, le 5'UTR contient une séquence d'origine procaryotique agissant comme un activateur de traduction (Ortega et al., 2012) alors que le 3'UTR est impliqué dans la stabilité des transcrits et le niveau de traduction (Ortega et al., 2006). Enfin, la régulation post-traductionnelle des GS1 fait notamment intervenir des phénomènes de phosphorylation. En effet, chez *Arabidopsis*, AtGLN1;1 est une des cibles de la protéine kinase calcium-dépendante AtCRK3 (Li et al., 2006). Chez le colza, il a été montré que cette régulation se faisait *via* un processus de phosphorylation réversible permettant une interaction avec des protéines 14-3-3 au niveau des feuilles sénescents (Finnemann and Schjoerring, 2000).

2) Asparagine Synthétases

2.1) Réaction catalysée et structure quaternaire



L'asparagine synthétase (AS) est une enzyme qui catalyse le transfert, ATP-dépendant, d'un groupement amide issu de la glutamine (ou directement une molécule d'ammonium dans certains cas) sur une molécule d'aspartate permettant, de ce fait, la formation d'asparagine (voir équation réactionnelle ci-dessus). Cet acide aminé possède l'avantage, par rapport à la glutamine, d'avoir un rapport N/C plus élevé (2/4 au lieu de 2/5) et donc de transporter plus d'azote.

Chez les procaryotes, il existe deux formes distinctes de l'AS : une forme dépendante de l'ammonium (type A ; EC 6.3.1.1 ; Nakamura et al, 1981) et une forme dépendante de la glutamine qui peut utiliser le groupement amide de la glutamine pour la synthèse d'asparagine (type B ; EC 6.3.5.4 ; Scofield et al, 1990). L'AS de type A est codée par le gène *asnA* qui est retrouvé uniquement chez les procaryotes alors que celle de type B est codée par le gène *asnB* retrouvé à la fois chez les procaryotes et chez les eucaryotes (Gaufichon et al, 2010). La structure quaternaire de l'enzyme dépend du type et de l'espèce étudiés. En effet, les AS-A et les AS-B sont toutes deux retrouvées sous

Figure III-7. Structure de l'AS de type B d'*Escherichia coli*. Représentation en ruban d'un dimère. La partie N-terminale (en jaune) est responsable de l'hydrolyse de la glutamine alors que la partie C-terminale (en bleu) est responsable de la production de l'aspartyl-AMP, intermédiaire réactionnel. (d'après la Figure 2 de Larsen et al, 1999).

<u>Gène</u>	<u>Numéro d'accension</u>
<i>AtASN1</i>	At3g47340
<i>AtASN2</i>	At5g65010
<i>AtASN3</i>	At5g10240

Tableau III-2. Gènes *ASN* d'*Arabidopsis thaliana*.

forme d'homodimères chez *Escherichia coli* (Figure III-7) alors que, chez *Klebsiella aerogenes*, le type A se présente également sous forme d'homodimères mais le type B est retrouvé sous forme de tétramères (Larsen et al, 1999 ; Reitzer et al, 1982).

2.2) L'asparagine synthétase chez les plantes

Chez Arabidopsis, les AS sont codées par les gènes de la famille *ASN* (trois gènes : *ASN1*, *ASN2* et *ASN3* ; Tableau III-2) étudiés par Laure Gaufichon pendant sa thèse de doctorat (Université Paris Sud XI, 2009). L'analyse phylogénétique réalisée, à partir des séquences nucléotidiques des différents gènes d'AS connus, par Gaufichon et al (2010) montre que les séquences des différentes AS forment deux classes distinctes comprenant chacune des séquences provenant de monocotylédones et de dicotylédones. Le gène *AtASN1* appartient à la classe I alors que les gènes *AtASN2* et *AtASN3* appartiennent à la classe II et ont donc une plus forte similarité de séquence entre eux qu'ils n'en ont avec les gènes *AtASN1*.

2.2.1) Rôles biologiques des asparagine synthétases

L'asparagine est un composé riche en azote et est donc une forme privilégiée de transport et de stockage de l'azote au sein de la plante jouant un rôle dans le métabolisme de l'azote à différentes étapes du développement de la plante comme la germination des graines ou le transport de l'azote pendant le recyclage au stade végétatif ou la remobilisation durant la sénescence (Lea et al., 2006).

2.2.1.1) Mobilisation de l'azote au cours de la germination

L'ARNm du gène *AtASN1* est présent dans les graines sèches (Nakabayashi et al., 2005) et permet la mise en place d'une activité asparagine synthétase au bout de 24 heures après imbibition, à la suite de la reprise du métabolisme. Cette activité provoque l'augmentation de la quantité d'asparagine au cours de la germination (Fait et al., 2006) qui permet la biosynthèse protéique *de novo* à partir de l'assimilation des produits du catabolisme des protéines de réserve. De la même manière, l'expression du gène *HAS2* est induite dans les 24 heures suivant l'imbibition (Herrera-Rodriguez et al., 2006) chez le tournesol. Certains gènes codant des asparagine synthétases semblent ainsi être responsables de la mobilisation de l'azote issu des réserves de la graine vers la plante afin que celle-ci soit capable de croître et émerger de la graine.

2.2.1.2) Rôle dans l'assimilation de l'azote pendant le développement végétatif

Les gènes *AtASN1* et *AtASN2* sont exprimés dans les feuilles (Lam et al., 1994), ils pourraient donc avoir un rôle au stade végétatif. L'étude du gène *AtASN2* a été publiée par Gaufichon et al

(2012). La mutation de ce gène provoque un phénotype de croissance ralentie, une accumulation d'ammonium et la disparition de la protéine des cellules compagnes. Ainsi, cette étude démontre le rôle de ce gène dans l'assimilation de l'ammonium et son transport au stade végétatif. Le gène *AtASN2* est induit par l'ammonium et par des stress comme le stress salin ou le froid (Wong, 2004). Il pourrait ainsi être responsable de la détoxification de l'ammonium produit au cours de ces stress et qui s'accumule dans les feuilles.

2.2.1.3) Rôle dans la remobilisation de l'azote pendant le développement des graines

L'étude des gènes d'asparagine synthétase (3 gènes *HAS1*, *HAS1.1* et *HAS2*; (Herrera-Rodriguez et al., 2002)) au cours de la sénescence chez le tournesol a montré l'induction des trois gènes au cours du vieillissement foliaire (Herrera-Rodriguez et al., 2006). Chez Arabidopsis, l'analyse du transcriptome des feuilles sénescentes a montré l'induction du gène *ASN1* (Guo et al., 2004). Les transcrits de ce gène ont été détectés au niveau des cellules compagnes du phloème (Gaufichon, 2009) suggérant un rôle de ce gène dans la remobilisation de l'azote vers les graines au cours de la sénescence. L'utilisation de l'isotope ^{15}N de l'azote a permis le marquage du nitrate apporté à des mutants *asn1* et le suivi des flux d'azote au sein de la plante. Il a pu être mis en évidence une diminution de la remobilisation du ^{15}N de la rosette vers les graines (Masclaux-Daubresse et al., 2010). Le gène *ASN2* est également exprimé dans les cellules compagnes du phloème et le mutant *asn2* présente un phénotype de sénescence ainsi qu'un défaut de recyclage vers les puits en formation (Gaufichon et al., 2012). La localisation vasculaire de l'asparagine synthétase est connue chez d'autres espèces comme le riz (Nakano et al., 2000). Ainsi, l'asparagine synthétase pourrait intervenir dans les processus de recyclage et de remobilisation de l'azote des feuilles sources sénescentes vers les puits en formation (*i.e.* nouvelles feuilles et graines, respectivement).

2.2.2) Régulation de l'expression des gènes codant les asparagine synthétases

Les divers rôles présentés dans la partie précédente reposent sur une régulation fine de l'expression des gènes codant les asparagine synthétases. En effet, diverses études ont montré une influence de la lumière, de sa qualité et des métabolites carbonés et azotés sur l'expression des gènes *ASN*.

2.2.2.1) Régulation par la lumière

Chez Arabidopsis, la lumière réprime l'expression du gène *ASN1* mais induit celle du gène *ASN2* (Lam et al., 1998). La répression de l'expression d'*ASN1* passe par l'intermédiaire du phytochrome car le niveau d'expression du gène change en fonction de la qualité de la lumière (rouge ou rouge lointain) (Lam et al., 1994). Gaufichon et al (2012) ont montré l'induction du gène

Figure III-8. Régulation des gènes *ASN1* et *ASN2* d'*Arabidopsis*. Les plantes ont été cultivées sous lumière ou noir continu avant l'application de l'obscurité, de la lumière, de sucres ou d'azote. Les flèches indiquent une activation, les traits une inhibition. (d'après la Figure 5 de Gaufichon et al, 2010).

ASN2 par l'obscurité en contradiction avec les résultats cités ci-dessus. Les auteurs expliquent cette différence par l'influence d'autres facteurs régulant également l'expression des gènes *ASN* comme les concentrations en métabolites carbonés et azotés. L'effet de la lumière sur les gènes codant les asparagine synthétases a également été étudié chez le tournesol (Herrera-Rodriguez et al., 2004). Les auteurs ont montré que les gènes *HAS1* et *HAS1.1* sont réprimés par la lumière comme *AtASN1* alors que le gène *HAS2* se comporte comme *AtASN2*. Il semble donc exister chez les plantes deux types d'asparagine synthétases différemment régulés par la quantité de lumière et sa qualité.

2.2.2.2) Régulation par les métabolites

Le métabolisme du carbone et la lumière sont liés car la fixation du carbone se fait grâce à l'énergie lumineuse. Ainsi, la disponibilité en sucres peut mimer l'effet de la lumière. En effet, le gène *ASN1* est réprimé par le glucose et le saccharose alors que le gène *ASN2* est induit par ces métabolites (Lam et al., 1998). De même, la lumière et la disponibilité des substrats carbonés permet l'activation du gène *HAS2* du tournesol alors que les gènes *HAS1* et *HAS1.1* sont réprimés par la lumière (Herrera-Rodriguez et al., 2004). Le statut carboné des plantes n'agit pas seul sur l'expression des gènes de l'AS. En effet, il apparaît que la disponibilité en métabolites azotés et le ratio C/N a également un impact. Les gènes *HAS1* et *HAS1.1* s'expriment en réponse à l'ammonium et au nitrate, en interaction avec l'effet du saccharose (Herrera-Rodriguez et al., 2004). *HAS2* et le gène *AtASN2* appartiennent à la même classe d'un point de vue phylogénétique et sont tous les deux réprimés par les acides aminés (Lam et al., 1998; Herrera-Rodriguez et al., 2004)

26

En conclusion, il existe chez les plantes deux types de gènes codant les AS et ceux-ci sont inversement régulés en fonction de la lumière et des concentrations en métabolites carbonés et azotés (Figure III-8). Cela suggère des rôles distincts dans le métabolisme de l'azote. Chez *Arabidopsis*, le gène *ASN1* semble participer au phénomène de remobilisation de l'azote pendant la formation des graines ainsi qu'à la reprise du métabolisme de l'azote à la suite de l'imbibition des graines. Le gène *ASN2* aurait un rôle dans le recyclage et la réassimilation de l'ammonium au stade végétatif. Bien qu'exprimé à un niveau plus faible, le gène *ASN3* aurait également un rôle dans le métabolisme azoté au stade végétatif avec un impact sur le développement des graines (Gaufichon, 2009).

3) Efforts biotechnologiques sur les GS et les AS pour la manipulation de la NUE

Le rôle essentiel de la GS dans le métabolisme azoté pour l'assimilation de l'azote inorganique en fait une cible de choix comme enzyme candidate dont la manipulation pourrait permettre une amélioration de la NUE. En effet, comme indiqué précédemment, la GS2 a un rôle prédominant dans la réassimilation de l'ammonium photorespiratoire dans les feuilles et la GS1 permet l'assimilation primaire d'ammonium au niveau racinaire ainsi que la réassimilation de l'ammonium issu du catabolisme protéique. Ce dernier phénomène est plus important au cours de la sénescence comme observé par l'augmentation des niveaux de transcrits de certains gènes *GS1* et la diminution du ratio activité GS2/activité GS1 dans les feuilles sénescentes, mettant en lumière un rôle des GS1 dans la remobilisation de l'azote vers les graines. Enfin, les liens entre gènes *GS1*, développement de la plante et caractères de rendement mis en évidence chez plusieurs espèces, ont amené à émettre l'hypothèse que l'augmentation de l'activité GS pourrait permettre l'accélération de la croissance végétative, une augmentation de la biomasse à ce stade et donc une augmentation de l'absorption d'azote. De plus, l'augmentation de l'activité GS en conditions limitantes en azote ou au cours de la sénescence pourrait permettre une meilleure remobilisation de l'azote des parties végétatives vers les graines. L'AS est également considérée comme une enzyme clé du métabolisme azoté chez les plantes du fait qu'elle permette, à partir de glutamine et d'aspartate, la synthèse d'asparagine, composé ayant un ratio N/C élevé et pouvant donc servir de composé de stockage ou de transport à longue distance de l'azote. Ainsi, différentes stratégies de surexpression de gènes codant GS1 et AS ont été mises en œuvre au fil des années, avec des résultats contrastés. Plusieurs auteurs ont regroupé et commenté les résultats obtenus au cours des différentes approches utilisées pour la recherche de l'amélioration de la NUE (Good et al., 2004; Xu et al., 2012; Thomsen et al., 2014).

La majorité des études rapportant une surexpression d'un gène *GS1* a été réalisée en utilisant des promoteurs constitutifs comme le promoteur 35S du virus de la mosaïque du tabac ou le promoteur ubiquitine du maïs, ou un promoteur fort comme celui de la petite sous-unité de la RuBisCO. L'augmentation de l'activité GS qui peut résulter de cette surexpression ne provoque pas nécessairement d'accélération de croissance, d'augmentation de la biomasse aérienne ni d'augmentation du rendement. De fait, la plupart des études ne montrent pas d'effets significatifs de la surexpression de GS1 sur la productivité des lignées transformées (Thomsen et al., 2014). Des effets sur la productivité ont été rapportés chez le blé, le maïs ou le riz (Habash et al., 2001; Cai et al., 2009; Brauer et al., 2011) mais ces effets ont été observés sur des plantes cultivées en conditions contrôlées dans des chambres de culture et les résultats n'ont, soit pas été observés en conditions

Figure III-9. Trois réponses différentes du métabolisme du glutamate de l'hôte en fonction des différentes stratégies de virulence des agents pathogènes. Les flèches vertes indiquent les voies associées à l'endurance alors que les flèches rouges indiquent les voies facilitant l'évasion. ARGAH : arginase ; AS : Asn synthetase ; AST : Asp transaminase ; GAD : Glu decarboxylase ; γ -GC : gamma glutamylcysteine ; GDC : glycine decarboxylase ; GDH : Glu dehydrogenase ; GOGAT : Gln-oxoglutarate aminotransferase ; GOX : glycolate oxidase ; GS : Gln synthetase ; GSH : glutathione ; GSHS : GSH synthetase ; NOS : nitric oxide synthase ; OCT : Ornithine carbamoyl-transferase ; OG : oxoglutarate ; PAO : polyamine oxidase; P5C: Δ^1 -pyrroline -5-carboxylate. (d'après la Figure 1 de Seifi et al, 2013).

moins contrôlées (culture en serre ou en champ), soit n'ont pas pu être répétés. Il semble donc que les conditions de culture aient une influence importante sur les phénotypes observés chez les lignées transgéniques qui surexpriment les GS1, de même que la disponibilité en azote (Fuentes et al., 2001). Les tentatives de surexpression de gènes *ASN* sont plus rares mais la surexpression du gène *ASN1* chez *Arabidopsis*, sous le contrôle du promoteur 35S, a permis l'obtention de plantes présentant une augmentation de la teneur en asparagine dans la sève et un meilleur statut azoté au niveau des graines avec une tolérance accrue des plantules à la limitation en azote (Lam et al., 2003).

Les gènes des familles *GLN1* et *ASN* présentent des régulations à plusieurs niveaux comme décrits précédemment pouvant expliquer l'absence d'effets des tentatives d'obtention de lignées à NUE améliorée. De plus, l'augmentation de l'activité GS ou AS de façon constitutive pourrait provoquer des perturbations métaboliques ayant, au final, des effets délétères sur la productivité. Ainsi, la surexpression tissu ou âge-spécifique (lors de la sénescence par exemple en utilisant le promoteur du gène *SAG12*) pourrait permettre de contourner les problèmes rencontrés jusqu'ici dans les stratégies de surexpression. Il pourra également être intéressant d'associer plusieurs constructions au sein d'une même lignée transformée. En effet, il serait intéressant de forcer la métabolisation de l'excès de glutamine et d'asparagine généré par la surexpression des gènes *GLN1* et *ASN* par la surexpression concomitante des autres acteurs (facteurs de transcription, molécules régulatrices, enzymes) impliqués dans le métabolisme de l'azote (Thomsen et al., 2014).

4) Métabolisme azoté et gestion des stress biotiques et abiotiques

Les interactions entre les plantes et les microorganismes phytopathogènes sont dépendantes de la disponibilité en azote dans l'environnement. En effet, celle-ci influe à la fois sur les défenses de la plante, sur la virulence des pathogènes et sur la sévérité de la maladie. Cependant, les mécanismes moléculaires qui sous-tendent les différents effets observés (qui peuvent être contradictoires suivant le pathosystème considéré) restent, pour la plupart, à étudier en détail. Il est probable que l'ensemble du métabolisme de l'azote et des acteurs moléculaires impliqués, joue un rôle dans ces interactions entre les plantes et leurs pathogènes. Ainsi, le système d'acquisition du nitrate, le métabolisme des acides aminés ou les systèmes de transport de l'azote semblent jouer un rôle dans les interactions plantes/pathogènes. L'ensemble de ces aspects est présenté dans la revue publiée récemment par Fagard et al (2014).

Concernant le métabolisme des acides aminés, une revue récente a pointé le rôle central du métabolisme du glutamate dans le développement de la maladie et la mise en place des réactions de

Figure III-10. Stratégie de virulence du pathogène versus métabolisme du glutamate de l'hôte. Modèle hypothétique montrant comment le métabolisme du glutamate de la plante peut moduler les réactions de défense en fonction de la stratégie de virulence du pathogène. AS : Asn synthetase ; AST : Asp transaminase ; GDH (AM/DAM) : Glu dehydrogenase (aminating/deaminating) ; GOGAT : Gln-oxoglutarate aminotransferase ; GOX : glycolate oxidase ; GS : Gln synthetase ; GSH : glutathione ; PAO : polyamine oxidation (PA-oxidase) ; P5C : pyrroline-5-carboxylate. (d'après la Figure 3 de Seifi et al, 2013).

défense par la plante (Seifi et al., 2013a). Le métabolisme du glutamate comprend trois grandes fonctions : le recyclage et la remobilisation de l'azote, la régulation de la balance redox et le métabolisme énergétique par la fourniture de composés du cycle de Krebs (Figure III-9). Les modulations complexes des différentes parties du métabolisme du glutamate en réponse à un agent pathogène permettent d'adapter la réponse de la plante à l'agent pathogène en fonction du cycle de vie de celui-ci. En effet, une stratégie dite « d'endurance » peut être mise en place par la plante afin de maintenir la viabilité des cellules et ainsi limiter la progression d'un pathogène nécrotrophe (augmentant par la même occasion la susceptibilité à un agent biotrophe). A l'inverse, la mise en place d'une stratégie « d'évasion » provoque la mort des cellules et permet de résister à un agresseur biotrophe. Ces deux stratégies et les acteurs moléculaires impliqués sont résumés dans la Figure III-10.

Les membres des familles *GLN1* et *ASN* sont impliqués dans les réponses des plantes aux agents pathogènes. En effet, il a été montré chez le tabac qu'un gène *GS1* est induit lors de l'infection par des pathogènes (Pageau et al., 2006) ; que l'expression des gènes *GLN1* d'*Arabidopsis* est modulée en réponse à différents pathogènes (*AtGLN1;1* est, par exemple, induit lors de l'infection par *Erwinia amylovora* ; Fagard et al., 2014) ; que l'infection du haricot commun par *Colletotrichum lindemuthianum* induit l'expression de la *GS1* (Tavernier et al., 2007). De plus, des publications récentes de l'équipe de M. Höfte ont montré que l'extinction de l'expression de la *GS1* dans le pathosystème mutant *sitiens* de la tomate/*Botrytis cinerea* provoque l'augmentation des symptômes de maladie (Seifi et al., 2013b). Dans ce pathosystème, l'induction de l'activité *GS1* permettrait le maintien de la viabilité cellulaire autour du site d'infection afin de limiter la progression du nécrotrophe. En effet, la *GS1* remplacerait alors la *GS2* pour faire tourner le cycle *GS/GOGAT* et permettre la fourniture de substrats du cycle de Krebs *via* le shunt du GABA. Récemment, Seifi et al (2014) ont montré une induction d'un gène *AS* chez la tomate en réponse à l'infection par *B. cinerea*, ainsi qu'une déplétion en asparagine des plantes infectées provoquée par une consommation par le champignon. L'induction de l'*AS* chez la tomate au niveau du phloème était déjà connue en réponse à *Pseudomonas syringae* (Olea et al., 2004) et chez le poivron en réponse à des pathogènes microbiens (Hwang et al., 2011). Il est montré dans cette étude que l'extinction du gène *AS1* provoque une augmentation de la susceptibilité des plantes aux agents pathogènes.

En plus de leur rôle dans la gestion des stress biotiques, les *GS1* et *AS* peuvent également jouer un rôle dans la gestion des stress abiotiques. Chez le tabac, l'activité *GS1* au niveau du phloème permet de réguler la synthèse de proline et la résistance au stress hydrique (Brugiere et al., 1999). Les stress salins et osmotiques provoquent une augmentation de l'expression de la *GS1* et de l'activité *GS* correspondante chez le tournesol (Santos et al., 2004) et l'expression de la *GS1*

augmente chez le tabac en réponse au stress oxydant (Pageau et al., 2006). L'exposition des plantes au cadmium provoque une augmentation du contenu en transcrits et protéines GS1 chez la tomate ainsi qu'une augmentation des transcrits de l'asparagine synthétase (Chaffei et al., 2004).

Une étude préliminaire de l'implication des gènes *GLN1* d'*Arabidopsis* dans la réponse à un stress biotique (infection par l'agent nécrotrophe *B. cinerea*) et abiotique (stress salin) a été réalisée par Camille Soulard, stagiaire de Master 2 en 2014. J'ai participé à l'élaboration de son sujet de stage, encadré son stage au quotidien d'un point de vue technique et participé à la correction de son rapport. Ce rapport figure en annexe.

IV Objectifs de recherche

Le colza est une espèce d'intérêt agronomique dont la culture nécessite l'apport d'intrants azotés en grande quantité. L'azote apporté n'est toutefois pas utilisé par cette plante de façon optimale en dépit d'une bonne capacité d'absorption à partir du sol. La mauvaise efficacité de remobilisation de l'azote de feuille à feuille (Malagoli et al., 2005a) conduit à une perte importante d'azote dans l'environnement par la chute de ces feuilles au stade végétatif. Dans le contexte actuel associant l'augmentation de la population mondiale ainsi que le coût économique et environnemental des intrants, il est nécessaire de diminuer la quantité d'engrais azotés apportée aux cultures tout en essayant de conservant des rendements et une qualité de la graine aux plus hauts niveaux. Chez le colza, cet objectif pourra être rempli à la condition de posséder une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans les flux d'azote au sein de la plante, et notamment, une meilleure connaissance des acteurs moléculaires de la remobilisation de l'azote aux stades végétatif et reproducteur.

La remobilisation des composés azotés au cours de la sénescence se traduit par une augmentation de la concentration en acides aminés dans la sève phloémienne et notamment des concentrations en glutamine et asparagine. Ces deux acides aminés sont des formes privilégiées de transport de l'azote au sein de la plante car ils possèdent un ratio azote / carbone élevé. La glutamine et l'asparagine, servant à la remobilisation de l'azote, sont synthétisées par l'action des glutamine synthétases cytosoliques et des asparagine synthétases, respectivement. Ces deux enzymes sont codées par des familles multigéniques (la famille des gènes *GLN1* et celle des gènes *ASN*) et certains des gènes de ces familles sont induits au cours de la sénescence. Ainsi, le but de ce travail de thèse a été (i) de caractériser l'expression des gènes *GLN1* et *ASN* chez *Arabidopsis* et le colza afin de comparer ces deux modèles et mettre en évidence des ressemblances de profils d'expression en fonction de l'âge foliaire et en réponse à l'azote ; et (ii) d'étudier la contribution des gènes *GLN1* et *ASN* dans le processus de remobilisation de l'azote des feuilles vers les graines en formation en utilisant des mutants d'*Arabidopsis*.

La partie Résultats sera organisée en quatre parties distinctes :

- Le chapitre I porte sur l'identification des membres de la famille *GLN1* chez le colza et l'étude de leur profil d'expression en fonction des tissus, de l'âge des feuilles et de la disponibilité en azote. Les résultats ont été valorisés par une publication, pour laquelle je suis co-premier auteur, dans la revue *Journal of Experimental Botany* (Orsel et al., 2014).

- Les résultats obtenus lors de l'étude de l'expression des cinq gènes *GLN1* d'*Arabidopsis* au niveau de la plante entière, au niveau tissulaire et au niveau cellulaire ont permis la rédaction d'une publication constituant le chapitre II des Résultats.
- Le chapitre III porte sur le phénotypage des mutants *gln1* dans le but d'identifier le rôle des GS1 dans le développement de la biomasse, l'établissement du rendement ou dans l'allocation des ressources azotées. Ce chapitre a également été rédigé sous forme de publication.
- Enfin, le chapitre IV expose les résultats obtenus lors de l'étude de l'expression des gènes *ASN* chez *Arabidopsis* en fonction des organes, de l'âge et de la disponibilité en azote ainsi que ceux obtenus lors de l'étude des mutants *asn* d'*Arabidopsis*, dans un but identique que l'étude décrite au chapitre III.

RÉSULTATS

I La famille *GLN1* chez *Brassica napus* : identification et analyse de l'expression en fonction de la sénescence et de la disponibilité en azote

1) Introduction

Comme nous l'avons vu précédemment en introduction, le colza d'hiver, majoritairement cultivé en France afin d'être valorisé en biodiesel, est une espèce qui se caractérise par une mauvaise efficacité d'utilisation de l'azote (Rathke et al, 2006) et qui, de ce fait, demande un haut niveau de fertilisation azotée (de l'ordre de 150 kg par hectare et par an selon le CETIOM). Malgré une forte capacité d'absorption de l'azote au stade végétatif (Laine et al., 1993; Malagoli et al., 2004), seul 50% de l'azote apporté à la culture est retrouvé au niveau des graines à la récolte (Schjoerring et al., 1995). Il a été montré que cette faible NUE provient d'un défaut de recyclage de l'azote de feuille à feuille lors de la sénescence séquentielle puis de feuilles à graines lors de la sénescence monocarpique (Malagoli et al., 2005a). Ainsi, la chute des feuilles sénescentes, avant que celles-ci ne soient complètement vidées de leur contenu en nutriments, aboutit à une perte importante d'azote pouvant représenter jusqu'à 15% de l'azote total contenu dans la plante (Rossato et al., 2001). La connaissance des mécanismes et des acteurs pouvant jouer un rôle dans ces processus de recyclage et remobilisation est donc de première importance. Chez le colza, comme chez de nombreuses autres espèces, la glutamine figure parmi les acides aminés majoritaires dans la sève phloémienne (Lohaus and Moellers, 2000; Lohaus and Schwerdtfeger, 2014). Cet acide aminé est synthétisé par des glutamine synthétases et il est connu qu'une induction des gènes codant les glutamine synthétases cytosoliques (GS1) a lieu au cours de la sénescence chez plusieurs espèces (Masclaux et al., 2000; Guo et al., 2004; Martin et al., 2006) dont le colza (Buchanan-Wollaston and Ainsworth, 1997). Ainsi, mes travaux de thèse sur le colza ont visé à mieux connaître la famille multigénique codant les GS1, dans le but d'accroître nos connaissances du métabolisme de l'azote chez cette espèce et de mettre en évidence des acteurs sur lesquels il sera possible d'agir dans l'avenir afin d'améliorer l'utilisation de l'azote. Mes résultats ont complété ceux obtenus précédemment par Mathilde Orsel, chargée de recherche INRA à Rennes. Mathilde a mis à ma disposition les séquences d'ADNc de GS1 identifiées sur différentes bases de données d'EST existantes pour le colza. Bien que le génome du colza ne soit pas encore publié, j'ai eu accès aux séquences génomiques codant les GS de *Brassica napus* grâce à Boulos Chalhoub et Jérémy Just de l'URGV. J'ai ainsi pu déterminer le nombre de gènes *GLN1* chez le colza, en déduire la structure exon/intron et extraire les séquences codantes des ARNm (Figure 2). J'ai ainsi pu corroborer les résultats obtenus par Mathilde Orsel sur d'autres génotypes que celui utilisé pour le séquençage du génome (Figure 1, Tableaux 2 et 4). La

production de matériel végétal sous serre en condition contrôlée m'a permis d'effectuer une analyse de l'expression des différents gènes identifiés, au stade végétatif, dans les limbes et veines de feuilles présentant différents degrés de sénescence foliaire et collectées sous deux niveaux de nutrition azotée (Figures 4, 5 et 6).

L'ensemble de ces résultats a été publié sous forme d'article dans *Journal of Experimental Botany*.

[2\) Article : Orsel et al \(2014\)](#)

RESEARCH PAPER

Sixteen cytosolic glutamine synthetase genes identified in the *Brassica napus* L. genome are differentially regulated depending on nitrogen regimes and leaf senescence

Mathilde Orsel^{1,2,3,4,*,†}, Michaël Moison^{5,6,†}, Vanessa Clouet¹, Justine Thomas¹, Françoise Leprince¹, Anne-Sophie Canoy⁷, Jérémy Just⁸, Boulos Chalhoub⁸ and Céline Masclaux-Daubresse^{5,6,*}

¹ INRA, UMR 1349 Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, INRA, Agrocampus Ouest, Université de Rennes 1, F-35653 Le Rheu, France

² INRA, UMR 1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, F-49071 Beaucouzé, France

³ Université d'Angers, UMR 1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, SFR 4207 QUASAV, PRES L'UNAM, F-49045 Angers, France

⁴ AgroCampus-Ouest, UMR 1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, F-49045 Angers, France

⁵ UMR1318, INRA, Institut Jean-Pierre Bourgin, RD10, 78026 Versailles cedex, France

⁶ AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin, RD10, 78026 Versailles cedex, France

⁷ Biogemma, Groupe de Recherche Génomique Amont, F-63028 Clermont-Ferrand, France

⁸ INRA-CNRS, Unité de Recherche en Génomique Végétale, 2 rue Gaston Crémieux, CP 5708, 91057 Evry Cedex, France

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: mathilde.orsel-baldwin@angers.inra.fr and celine.masclaux@versailles.inra.fr

† These authors contributed equally to this work.

Received 1 November 2013; Revised 20 December 2013; Accepted 16 January 2014

Abstract

A total of 16 *BnaGLN1* genes coding for cytosolic glutamine synthetase isoforms (EC 6.3.1.2.) were found in the *Brassica napus* genome. The total number of *BnaGLN1* genes, their phylogenetic relationships, and genetic locations are in agreement with the evolutionary history of *Brassica* species. Two *BnaGLN1.1*, two *BnaGLN1.2*, six *BnaGLN1.3*, four *BnaGLN1.4*, and two *BnaGLN1.5* genes were found and named according to the standardized nomenclature for the *Brassica* genus. Gene expression showed conserved responses to nitrogen availability and leaf senescence among the Brassiceae tribe. The *BnaGLN1.1* and *BnaGLN1.4* families are overexpressed during leaf senescence and in response to nitrogen limitation. The *BnaGLN1.2* family is up-regulated under high nitrogen regimes. The members of the *BnaGLN1.3* family are not affected by nitrogen availability and are more expressed in stems than in leaves. Expression of the two *BnaGLN1.5* genes is almost undetectable in vegetative tissues. Regulations arising from plant interactions with their environment (such as nitrogen resources), final architecture, and therefore sink–source relations *in planta*, seem to be globally conserved between *Arabidopsis* and *B. napus*. Similarities of the coding sequence (CDS) and protein sequences, expression profiles, response to nitrogen availability, and ageing suggest that the roles of the different *GLN1* families have been conserved among the Brassiceae tribe. These findings are encouraging the transfer of knowledge from the *Arabidopsis* model plant to the *B. napus* crop plant. They are of special interest when considering the role of glutamine synthetase in crop yield and grain quality in maize and wheat.

Key words: Allopoloidization, *Brassica napus*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, nitrogen metabolism, nitrogen remobilization, senescence.

Abbreviations: GS, glutamine synthetase; GLN1, cytosolic glutamine synthetase gene; GSL, chloroplastic glutamine synthetase gene.

© The Author 2014. Published by Oxford University Press on behalf of the Society for Experimental Biology.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

Winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) is the dominant oilseed crop in northern Europe, and nitrogen (N) fertilization is the main operational cost for farmers (50% of the total cost of production). When compared with other crops, oilseed rape is characterized by low nitrogen use efficiency (NUE) (Rathke *et al.*, 2006). Despite a high N-uptake efficiency (Laine *et al.*, 1993), only half the N originating from fertilizer application is recovered in the seeds (Schjoerring *et al.*, 1995). Oilseed rape is characterized by early leaf shedding and unusual high N loss in senescing falling leaves. The plant can lose up to 15% of its entire N content in this way (Rossato *et al.*, 2001). Leaf senescence generally corresponds to the mobilization of N reserves from source leaves to sink organs such as seeds (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008). In oilseed rape, it has been shown that N can be remobilized from senescing leaves to expanding leaves at the vegetative stage (sequential senescence) as well as from senescing leaves to seeds at the reproductive stage (monocarpic senescence) (Malagoli *et al.*, 2005).

The rate of senescence and remobilization of leaf N are related to the N nutrition status of the plant and to source–sink relations (Masclaux *et al.*, 2000). N remobilization towards new developing organs is largely dependent on senescence-related catabolism events and translocation of leaf N compounds. Amino acids derived from protein catabolism are exported via the phloem to growing parts of the plant; the concentration of amino acids in the phloem sap increases during leaf senescence (Herrera-Rodriguez *et al.*, 2006, 2007; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006). In many species including *B. napus*, aspartate, glutamate, and their corresponding amides are the principal forms of amino N compounds transported in the phloem and play a key role in rendering N available for remobilization from senescing leaves (Tilsner *et al.*, 2005). Enzymes involved in the biosynthesis and metabolism of amino acids destined for phloem loading are of special interest.

In plants, glutamine synthetase (GS; EC 6.3.1.2) is a key enzyme which catalyses an ATP-dependent conversion of glutamate to glutamine using ammonium derived from primary N uptake and various internal N recycling pathways including catabolic release of ammonium during senescence (Bernard and Habash, 2009). In a large variety of plants, induction of cytosolic glutamine synthetase (GS1) genes has been detected during leaf senescence, while chloroplastic synthetase isoenzyme (GS2) expression decreases (Masclaux *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2006). It has been proposed that in young photosynthetic leaves, the chloroplastic isoenzyme GS2 is mainly involved in the assimilation of ammonium provided by nitrate reduction and photorespiration through the GS/GOGAT cycle (Masclaux *et al.*, 2001). In old senescing leaves, as chloroplasts are breaking down, glutamine to be exported would be synthesized by the newly expressed cytosolic GS1 isoforms (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006).

The importance of GS1 in N management, growth rate, leaf senescence onset and severity, yield, and grain filling

has been confirmed by co-location of quantitative trait loci (QTLs) and functional genomics approaches mainly performed on maize (Hirel *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2006) and rice (Tabuchi *et al.*, 2005). In maize, *Gln1.4* is up-regulated during senescence (Martin *et al.*, 2005). The *Gln1.4* knock-out mutation led to a dysfunction in N export and a sharp reduction of kernel yield (Martin *et al.*, 2006). GLN1.4 was proposed to be involved in re-assimilation of ammonium released during leaf protein degradation. In rice, mutants lacking *OsGS1;1* are severely impaired in growth rate and grain filling, and glutamine levels in mutant leaf blades are reduced (Tabuchi *et al.*, 2005). As the gene product is located in companion cells and parenchyma cells of leaf tissues, it has been proposed that *OsGS1;1* is responsible for generation of glutamine for remobilization via the phloem.

To date, all studies on plant genomes have revealed multi-genic families coding for several GS1 isoforms. In rice, three *GLN1* genes have been identified, with seven in wheat, five in maize, and five in *Arabidopsis thaliana*. Transcriptomic data showed that three *A. thaliana* genes, *AtGLN1.1*, *AtGLN1.2*, and *AtGLN1.4*, are induced during leaf ageing (Guo *et al.*, 2004). Promoter::GFP (green fluorescent protein) fusions were used to investigate *AtGLN1* gene expression in roots. *AtGLN1.1* was localized at the root surface layer, whereas *AtGLN1.2*, *AtGLN1.3*, and *AtGLN1.4* were expressed in root vascular tissues (Ishiyama *et al.*, 2004). Detailed expression of *AtGLN1* in leaves was only reported for *AtGLN1.2* that is induced in root and leaf tissues under a high N regime and is mainly expressed in veins and mesophyll cells in older leaf tissues (Lothier *et al.*, 2011). In veins, *AtGLN1.2* protein was localized in the companion cells. The knock-out mutant phenotype led to the conclusion that *AtGLN1.2* is essential for N assimilation under ample nitrate supply and for ammonium detoxification (Lothier *et al.*, 2011). For all plant species, it is clear that not all GS1 isoforms participate equally in N management and remobilization. Regulation of expression is then a key clue towards the identification of *GLN1* genes potentially involved in N remobilization.

Accumulation of GS1 and a decrease in GS2 polypeptides were observed in *B. napus* leaves after onset of leaf senescence (Ochs *et al.*, 1999). Up to now, four closely related genes coding for GS1 isoenzymes, *BnGSR1-1*, *BnGSR1-2*, *BnGSR2-1*, and *BnGSR2-2*, have been identified using *B. napus* root-derived expressed sequence tag (EST) libraries (Ochs *et al.*, 1999). Analysis of different tissue types has also revealed that these genes are expressed in senescing leaves (Buchanan-Wollaston and Ainsworth, 1997). Recent studies of Brassicaceae genomes show that the genome of *B. napus*, which is a recent allotetraloid ($2n=4x=38$, AACC) arising from the natural hybridization of monogenomic diploids *Brassica rapa* (AA) and *Brassica oleracea* (CC) (Nagaharu, 1935), contains additional genes coding for GS1 isoenzymes. Analysis of *Brassica* lineage genomes revealed that a whole-genome triplication occurred shortly after their divergence from *Arabidopsis* (Parkin *et al.*, 2005). Therefore, gene families are more frequent, larger, and more complex in *B. napus*

than in *A. thaliana*. Brassicaceae genome sequences are also highly conserved and many syntenic regions have been identified (Paterson *et al.*, 2001; Parkin *et al.*, 2005; Schranz *et al.*, 2006), allowing the identification of 'true' orthologous genes between *A. thaliana* and *B. napus*.

In the present study, advantage is taken of the Brassicaceae genome structure and of its recent sequencing (unpublished) in order to identify all *BnaGLN1* genes coding for GS1 isoenzymes. It is demonstrated that they are differentially regulated depending on tissue type, senescence, and N availability. The potential role of the *BnaGLN1* genes in N remobilization during leaf senescence, the impact of whole-genome duplications and merging on the evolution of the *GLN1* multigenic family in the Brassicaceae tribe, and strategies based on knowledge transfer from *A. thaliana* to crop plants are discussed.

Materials and methods

Brassica gene identification

Sequence searches by similarity to *A. thaliana* *AtGLN1* coding sequences were performed in the GenBank and Genoplate databases using the BLAST algorithm (Altschul and Lipman, 1990) and the *A. thaliana* *AtGLN1* coding sequences *AtGLN1.1* (NM_123119, At5g37600), *AtGLN1.2* (NM_105291, At1g66200), *AtGLN1.3* (NM_112663, At3g17820), *AtGLN1.4* (NM_121663, At5g16570), and *AtGLN1.5* (NM_103743, At1g48470). The BlastN option was used to recover *B. napus*, *B. rapa*, and *B. oleracea* ESTs and complete mRNAs as well as genomic sequences of *B. napus* and *B. rapa* (Cheng *et al.*, 2011; <http://brassicadb.org/brad/>). Contigs of ESTs were built using the CAP3 algorithm (Huang and Madan, 1999) and validated through multiple sequence alignments with ESTs and *AtGLN1* coding sequences, allowing a manual proofreading. Alignments were generated with the ClustalW algorithm (Thompson *et al.*, 1994) using Clustalw-sequence and Clustalw-profile options available at the MOBYLE platform (<http://mobyle.pasteur.fr>). ESTs included in each contig are listed in Supplementary Data File 1 available at JXB online.

BnaGLN1 contigs were then enriched and/or their coding sequence completed with new cDNA sequences: clones from Genoplate oilseed rape cDNA libraries and the ADIZ-MPIZ 021 library corresponding to ESTs were sequenced when available (Supplementary Table S1 at JXB online). When the coding sequence from cDNAs was incomplete or no clone was available, specific primers were designed to clone the total or missing coding region (Supplementary Table S2). The amplified fragments were cloned into pGEM[®]-T Easy plasmids (Promega) according to the recommendation of the supplier, and sequenced. Universal T6 and SP7 primers, as well as specific primers were used to sequence the clones on the positive and negative strands (Supplementary Table S3). All DNA sequencing was performed by Cogenics (Grenoble, France) and sequences were submitted to GenBank (accession numbers are given in Supplementary Table S1).

Sequence analysis

A global alignment of coding sequences from mRNA, inferred coding sequences, or newly created contigs from ESTs was generated with ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Distance matrixes were computed using the Dnastist algorithm with a Kimura 2 nucleotide substitution model, and bootstrap analysis was performed with 1000 iterations. A consensus unrooted tree was then generated using the Neighbor-Joining method. All algorithms are contained in the Phylip 3.67 package available at the MOBYLE platform (<http://mobyle.pasteur.fr>). The NCBI Conserved Domain Database (Marchler-Bauer *et al.*, 2011) was searched with translated *B. napus* and

A. thaliana *GLN1*-coding sequences. A multiple protein sequence alignment was generated with the ClustalW algorithm.

Genetic mapping and genome or chromosome assignment

Genetic mapping of *BnaGLN1* genes was realized using three different *B. napus* double haploid (DH) populations. The Stellar×Drakkar (SD), Darmor×Samourai (DS), and Darmor-*bzh*×Yudal (DY) populations consist, respectively, of 94, 134, and 445 genotype DH lines described by Lombard and Delourme (2001) and Delourme *et al.* (2006). Gene-specific primers were designed and selected for a presence/absence polymorphism in one of the three populations (Supplementary Table S2 at JXB online). Linkage analyses were performed as previously described by Auger *et al.* (2009) using MAPMAKER/EXP version 3.0b (Lander *et al.*, 1987) and framework maps constructed in Lombard and Delourme (2001) and updated in Delourme *et al.* (2006). *BnaGLN1* genes were assigned to a linkage group using the ASSIGN command (LOD threshold=8.0) and then placed in the most confident interval with the PLACE command (LOD threshold=2.0). Recombination frequencies were converted into centiMorgans (cM) with the Kosambi function (Kosambi, 1944).

BnaGLN1 gene assignment to A or C *Brassica* genomes was performed using a panel of diverse *B. napus*, *B. oleracea*, and *B. rapa* genotypes available in the authors' group. The panel contains genomic DNA from *B. napus* genotypes Darmor-*bzh*, Yudal, Stellar, Drakkar, Samourai, aburamassari, Aviso, Tenor, Express, Montego; *B. rapa* genotypes Z1, C1.3, Chiifu; and *B. oleracea* genotypes HDEM and C102. This panel was PCR screened with specific but not polymorphic gene markers (Supplementary Table S2 at JXB online).

Chromosome assignment for *BnaC.GLN1* genes was realized using monosomic and polysomic addition lines carrying one or several additional C chromosomes from Darmor-*bzh*. Lines were selected from a cross between *B. napus* Darmor-*bzh* and *B. oleracea* C1.3 (A.M. Chèvre and F. Eber, INRA Rennes, unpublished results). Genomic DNA from these lines was PCR screened with specific but not polymorphic markers (Supplementary Table S2 at JXB online).

Plant material and growth conditions

Brassica napus L. plants from the Darmor-*bzh* genotype were grown in a greenhouse at INRA Versailles, France. Seeds were sown on sand and watered with nutritive solution during 2 weeks in order to allow germination and subsequent growth of plantlets. When the first two true leaves appeared, plantlets were transferred into pots containing sand and were separated into two groups with contrasting N fertilization regimes (LN for low nitrate and HN for high nitrate, 0.4 mM and 8 mM NO₃⁻, respectively) according to Albert *et al.* (2012). At 56 d after sowing, four plants of each nutrition regime were harvested and sampled. For each plant, all leaf ranks were collected: primary and secondary veins were separated from the rest of the leaf, described as the limb. All fresh samples were frozen immediately in liquid nitrogen and stored at -80 °C.

Brassica napus L. plants from the Express genotype were grown in field trials in 2009–2010, in Le Rheu (Brittany), France. Seeds were sown on 7 September 2009 with plant density set at 40 plants m⁻². The field trial was conducted with contrasting N fertilization regimes. Plant N status was monitored over the vegetative stage by calculating the nitrogen nutrition index (NNI) (Colnenne *et al.*, 1998). The balance-sheet method was used as a decision tool for N fertilization, setting the potential yield for LN and HN regimes at 20 q ha⁻¹ and 35 q ha⁻¹, respectively (Makowski *et al.*, 2005). LN plants did not receive N fertilizer, while the HN plants received a total input of 110 kg N ha⁻¹ spread at two different times (12 February and 19 March 2010). LN and HN plants were harvested, respectively, on 9 and 12 April, at the beginning of the flowering period when half the plants of the plot had their first flowers open on the main stem (F1,

or 60 on the BBCH scale), and 400 degree-days later (base 0) on 17 and 20 May at the beginning of the seed filling period (G2, or 71–73 on the BBCH scale).

Plants from 0.5 m² per plot (~20 plants) were harvested in the early morning and sampled during the subsequent hour. For each batch, plants were ranked according to their length and developmental stage; the six median plants were selected for sampling. On the main stem, the lowest leaf starting to yellow (Old) and the highest leaf at least 5 cm long (Young) were selected, the petiole and main vein were removed, and limbs were sampled. The stems above young and old leaf insertions were selected and sampled over 2 cm and 4 cm, respectively. All fresh samples were frozen immediately in liquid nitrogen and stored at –80 °C.

Nucleic acid manipulation

PCRs were conducted in a 20 µl mix containing 2–10 ng of DNA, 0.25 mM dNTPs (Promega), 0.5 µM of each primer (Eurogentec, Angers, France), and 0.5 U of *Taq* DNA polymerase (Promega) in the appropriate buffer supplemented with 2.5 mM MgCl₂. The amplification program was run on a PTC-225 thermocycler (MJ Research, Waltham, MA, USA) with the following conditions: 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s (3 min for the first cycle), annealing at 55–60 °C for 30 s, and elongation at 72 °C for 1–2 min (10 min for the last cycle).

Total RNAs were extracted with the SV Total RNA Isolation System (Promega) from 70 mg fresh weight (FW) of ground frozen tissue. First, samples were homogenized in the RNA lysis buffer (400 µl) using TissueLyserII from Qiagen. Then, all cell debris was eliminated by filtering the lysate through a 'Nucleospin 96 RNA filter Plate' (Macherey-Nagel). The manufacturer's protocol was then followed. In order to remove any remaining DNA traces, 1.5 µg of RNA was treated with DNase using the Turbo DNA-free kit (Ambion) according to the manufacturer's protocol. The quality of RNA was assessed by an electrophoresis on agarose gel (1.3%, w/v), and the absence of DNA contamination in samples was confirmed by PCR amplification. First-strand cDNA was synthesized using 2 µg of total RNA with oligo(dT)_{12–18} primers and Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Two independent reverse transcription reactions were performed as technical replicates. cDNA samples were diluted 26-fold with sterile water before use.

Gene expression analysis with qPCR

Quantitative PCRs (qPCRs) were set up with the LightCycler 480 SYBR Green I Master mix (Roche Diagnostics) and 4 µl of diluted cDNA in a final volume of 12 µl. The concentration of specific forward and reverse primers was set at 0.42 µM. qPCRs were run on a Light Cycler LC480 (Roche Diagnostics) under the following conditions: an initial step at 95 °C for 10 min, then 50 cycles of 95 °C for 10 s, 60 °C for 10 s, and 72 °C for 20 s.

Primer pairs were designed for short and specific amplification of individual members of the multigenic *BnaGLN1* family and five reference genes (Supplementary Table S4 at JXB online). Identification of *B. napus* reference genes for reverse transcription–qPCR analysis was based on EST sequence similarity to *A. thaliana* genes with verified expression stability over a wide range of tissues and growing conditions. *Arabidopsis thaliana* genes were selected from among the list established by Czechowski *et al.* (2005). Their respective coding sequences were used to retrieve highly similar *B. napus* ESTs from GenBank using the BlastN algorithm. One *B. napus* EST per reference gene was selected to design qPCR primers (Supplementary Table S4).

For each run, single product amplification was confirmed by melt curve analysis. PCR products from each primer pair and genotype were sequenced in a preliminary analysis. The amplification efficiency was assessed for each genotype, with each primer pair using a dilution curve method over six orders of magnitude, on a pool of

cDNAs from different tissues and modalities. Selected primer pairs have efficiencies >1.8.

The results reported were obtained from four biological replicates and two reverse transcriptions as technical replicates. All samples, including reverse transcription and biological replicates, were run at the same time for each primer pair. Raw fluorescence data were collected and analysed with the R package 'qpcR' (Ritz and Spiess, 2008). The 'pcrbatch' function was used to select sigmoid models for the fluorescence curves and then allowing the determination of the intrinsic amplification efficiency (sig.eff) and threshold cycle (sig.CpD2) at the second derivative maximum (Rutledge, 2004). For each run, cDNA relative quantity (RQ) was calculated using the efficiency mean value from the two technical and the four biological repetitions (mean sig.eff), and the run-specific threshold cycle as: $RQ = 1/(\text{mean sig.eff})^{\text{sig.CpD2}}$.

The most stable reference genes were selected using the GeNorm method from Vandesompele *et al.* (2002) available through the 'SLqPCR' R package (Dr Matthias Kohl SIRS-Lab GmbH). The four reference genes *BnaX.PTB*, *BnaX.SAND*, *BnaX.PP2A*, and *BnaX.UBC21* from the five tested were retained with an average M value equal to 0.33. For each cDNA sample, a normalization factor (NF) was calculated as the geometrical mean of RQ from the four selected genes, and normalized RQ (NRQ) was then calculated as $NRQ = RQ/NF$. The mean of both technical replicates was then calculated for each sample.

Results

Identification of GLN1 coding sequences in EST databases of Brassica napus and its progenitors Brassica oleracea and Brassica rapa

A total of 588 *B. napus* ESTs, 126 *B. rapa* ESTs, and 36 *B. oleracea* ESTs highly similar to one or several of the five *AtGLN1.1–AtGLN1.5* mRNA-coding sequences from *A. thaliana* were isolated from public and private Genoplante databases (Supplementary Data File S1 at JXB online). Sequence assembly and alignments with *AtGLN1* mRNA sequences revealed different groups of transcripts that allowed ESTs to be grouped and 16 individual contigs that might correspond to different *BnaGLN1* genes of *B. napus* to be extracted (Supplementary Data File S2). Eight contigs for *B. rapa* and seven contigs for *B. oleracea* were also isolated (Supplementary Data Files S1, S2). The *BnaGLN1*, *BraGLN1*, and *BolGLN1* contigs from *B. napus*, *B. rapa*, and *B. oleracea*, respectively, show high levels of sequence similarity with all the five *AtGLN1* genes (Table 1). The analysis of similarity levels and a phylogenetic tree (Fig. 1) allowed homologous sequences for each *AtGLN1* mRNA to be clearly identified in *B. napus*, *B. rapa*, and *B. oleracea*. The phylogenetic tree reveals that the *GLN1* mRNA sequences are divided into two distinct groups for monocotyledonous (wheat, maize, and rice) and dicotyledonous species. The Brassicaceae sequences are divided into five clusters, each one including one *A. thaliana* and one or several *B. napus*, *B. oleracea*, and *B. rapa* sequences (Fig. 1). Each *B. napus* sequence is closely related to one sequence from either *B. oleracea* or *B. rapa* progenitors, illustrating the ancestral relationship with the A and C *Brassica* genomes. Each *B. napus* sequence is also closely related to one of the five *A. thaliana AtGLN1* mRNA sequences, allowing the identification of homeologous related sequences between the

Table 1. *BnaGLN1* proteins and nucleotide sequence identities

The percentage identity within the *BnaGLN1* and *AtGLN1* family between contig nucleotide coding sequences (top right), and between translated protein sequences (bottom left). Contig names are used for the column index and protein names for the line index.

	<i>AtGLN1.1</i>	<i>BnaGLN1.1_C1</i>	<i>BnaGLN1.1_C2</i>	<i>AtGLN1.2</i>	<i>BnaGLN1.2_C1</i>	<i>BnaGLN1.2_C2</i>	<i>AtGLN1.3</i>	<i>BnaGLN1.3_C2</i>	<i>BnaGLN1.3_C1</i>	<i>BnaGLN1.3_C4</i>	<i>BnaGLN1.3_C3</i>	<i>BnaGLN1.3_C5</i>	<i>BnaGLN1.3_C6</i>	<i>AtGLN1.4</i>	<i>BnaGLN1.4_C1</i>	<i>BnaGLN1.4_C2</i>	<i>BnaGLN1.4_C4</i>	<i>BnaGLN1.4_C3</i>	<i>AtGLN1.5</i>	<i>BnaGLN1.5_C2</i>	<i>BnaGLN1.5_C1</i>
<i>AtGLN1.1</i>	–	92.7	93.1	87.5	87.5	88.0	78.8	78.2	77.7	76.6	77.1	77.5	77.0	78.4	79.9	79.7	78.8	78.9	74.7	74.1	73.9
<i>BnaA.GLN1.1.a</i>	94.4	–	97.9	87.1	87.7	88.0	78.3	77.4	77.2	76.3	77.1	77.0	76.8	79.1	81.3	81.0	79.8	79.5	74.4	73.1	73.2
<i>BnaC.GLN1.1.a</i>	94.4	98.3	–	87.1	87.4	88.0	78.2	77.5	77.0	76.0	76.8	77.2	77.0	78.7	81.1	80.8	79.6	79.4	74.8	73.5	73.6
<i>AtGLN1.2</i>	92.2	92.2	91.1	–	91.4	91.8	78.1	77.4	77.1	75.9	77.3	77.4	76.8	78.8	79.2	79.6	78.1	78.3	74.4	73.6	73.7
<i>BnaA.GLN1.1.b</i>	92.7	93.9	92.7	95.5	–	99.1	77.7	77.1	77.0	76.5	77.4	76.8	76.4	79.4	79.6	79.8	78.1	78.7	73.6	73.2	73.3
<i>BnaC.GLN1.1.b</i>	93.3	93.3	93.3	95.5	99.4	–	78.1	77.5	77.4	76.4	77.4	77.3	76.8	79.9	80.1	80.2	78.5	79.1	74.0	73.4	73.5
<i>AtGLN1.3</i>	85.8	86.3	85.8	83.8	84.9	84.9	–	90.8	90.3	89.3	89.9	90.5	90.4	76.1	76.9	76.5	76.0	76.2	80.7	80.0	80.0
<i>BnaA.GLN1.3.a</i>	84.6	85.5	85.2	83.8	84.4	84.4	94.1	–	97.1	92.8	93.7	93.2	93.0	75.4	76.3	75.8	75.1	75.4	81.0	81.2	81.4
<i>BnaC.GLN1.3.a</i>	84.6	85.5	85.2	83.8	84.4	84.4	94.1	100	–	93.3	94.2	93.5	93.1	75.8	76.5	76.0	75.0	75.5	80.3	80.4	80.5
<i>BnaA.GLN1.3.b</i>	83.2	84.4	83.5	83.0	84.1	83.5	93.0	96.1	96.1	–	97.7	93.2	93.2	75.9	76.5	76.0	75.7	76.0	80.1	80.0	80.1
<i>BnaC.GLN1.3.b</i>	83.2	84.4	83.5	83.0	84.1	83.5	93.0	96.1	96.1	100	–	94.0	93.9	76.2	76.9	76.5	75.9	76.1	80.3	80.2	80.3
<i>BnaA.GLN1.3.c</i>	83.8	85.2	84.9	82.7	83.2	83.2	93.9	95.8	95.8	94.7	94.7	–	98.6	76.6	76.4	76.3	75.9	76.0	80.1	80.4	80.3
<i>BnaC.GLN1.3.c</i>	83.2	84.6	84.4	82.1	82.7	82.7	93.9	95.3	95.3	94.7	94.7	99.4	–	76.5	76.4	76.3	76.2	76.0	80.6	80.8	80.7
<i>AtGLN1.4</i>	88.5	87.4	87.7	86.6	87.4	88.0	83.0	83.0	83.0	82.4	82.4	82.4	82.7	–	92.0	91.6	91.8	92.0	74.7	73.8	73.6
<i>BnaA.GLN1.4.a</i>	88.5	88.3	88.5	88.0	88.3	88.8	83.2	83.8	83.8	82.1	82.1	82.4	82.7	95.3	–	97.4	93.6	93.0	74.3	73.7	73.7
<i>BnaC.GLN1.4.a</i>	88.0	87.7	88.0	87.7	88.0	88.5	83.0	83.5	83.5	81.8	81.8	82.1	82.4	95.0	99.2	–	92.9	92.8	74.3	73.6	73.7
<i>BnaA.GLN1.4.b</i>	89.1	88.0	88.3	88.0	88.5	89.1	83.2	83.5	83.5	81.8	81.8	82.1	82.4	96.4	96.6	96.4	–	97.3	73.7	72.6	72.7
<i>BnaC.GLN1.4.b</i>	88.5	88.0	88.3	87.7	88.5	89.1	83.8	83.8	83.8	82.4	82.4	82.4	82.7	96.6	96.4	96.1	99.2	–	74.4	72.8	73.1
<i>AtGLN1.5</i>	78.8	80.4	80.4	78.8	79.1	79.6	83.0	83.2	83.2	82.1	82.1	82.7	82.4	79.3	79.6	79.3	79.3	79.6	–	91.3	91.1
<i>BnaA.GLN1.5.a</i>	79.6	80.4	80.4	78.8	79.1	79.6	83.8	83.5	83.5	83.2	83.2	83.5	83.2	79.6	79.1	78.8	79.1	79.3	95.0	–	98.7
<i>BnaC.GLN1.5.a</i>	79.6	80.4	80.4	78.8	79.1	79.6	83.8	83.5	83.5	83.2	83.2	83.5	83.2	79.6	79.1	78.8	79.1	79.3	95.0	100	–

Light grey indicates percentage identity between *A. thaliana* and *B. napus* orthologous genes.

Dark grey indicates identity between *B. napus* homeologous genes.

Identities >95% are in bold.

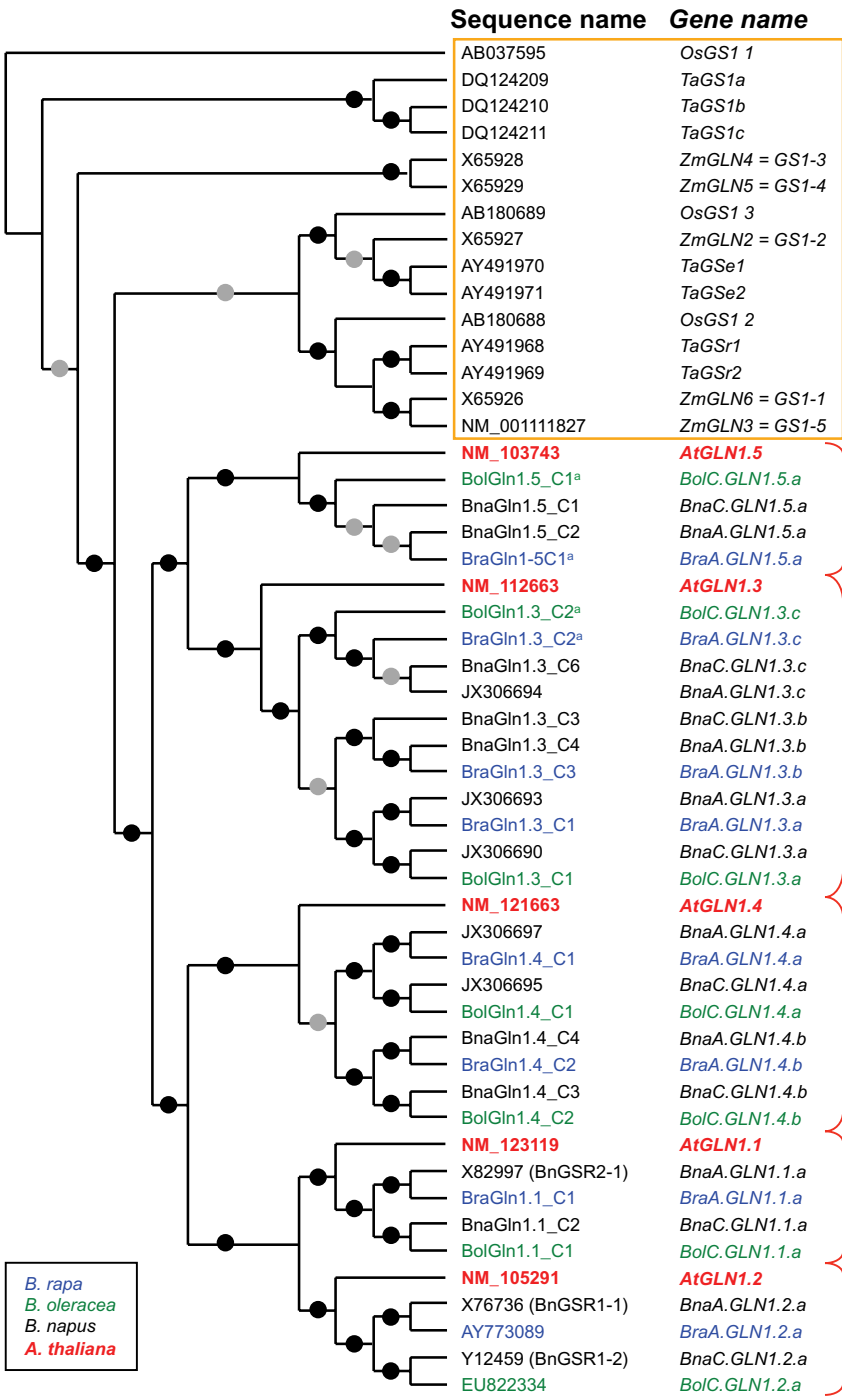


Fig. 1. Cytosolic glutamine synthetase (GS1) phylogenetic tree. DNA coding sequences (CDS) were aligned using Clustal. The distance matrix was computed using Dnadist with a Kimura 2 nucleotide substitution model (bootstrap analysis, 1000 iterations). A consensus unrooted tree was then generated using the Neighbor-Joining method from the Phylip 3.67 package. Black and grey dots indicate bootstrap values >90% and 50%, respectively. All programs are available at www.mobyli.pasteur.fr. ^aIncomplete CDS sequence when compared with the *A. thaliana* reference sequence.

four species. The contigs were then named according to the *AtGLN1.x* (*x* from 1–5) gene with the highest sequence similarity. Since for each *AtGLN1.x* sequence several *BnaGLN1* sequences were found, contig names were also extended by a copy number (Cn): *BnaGLN1.x_Cn* (Tables 1, 12; Fig. 1). Similarly, the names of the *B. rapa* and *B. oleracea* contigs follow the same rules (*BraGLN1.x_Cn* and *BolGLN1.x_Cn*, respectively; Table 2).

Most of the EST assemblies have been confirmed through sequencing partial or full-length cDNA clones when available (Supplementary Table S1 at JXB online). For the few EST assemblies that cannot be confirmed in this way, the cloning of missing coding sequences (CDS) was performed by designing primers from the *B. rapa* and *B. oleracea* homologous contig sequences (see the Materials and methods). This allowed the completion of the *BnaGLN1.4_C3* and *BnaGLN1.4_C4* sequences.

Table 2. Names of contigs of ESTs, mRNA, and AtGLN1 homologous genes in *Brassica napus*, *B. oleracea*, and *B. rapa*

The names of genes encoding each contig were assigned according to the [Ostergaard and King \(2008\)](#) nomenclature, taking into account A or C genome location, and the closest AtGLN1 sequence homology.

<i>A. thaliana</i>	<i>Brassica napus</i>		<i>Brassica oleracea</i>		<i>Brassica rapa</i>	
Gene name	Name of contig of ESTs; mRNA name	Gene name	Name of contig of ESTs; mRNA name	Gene name	Name of contig of ESTs; mRNA name	Gene name (BRAD name; LG) ^a
<i>AtGLN1.1</i> (At5g37600)	BnaGLN1.1_C1; X82997 (BnGSR2.1)	<i>BnaA.GLN1.1.a</i>	BolGLN1.1_C1	<i>BolC.GLN1.1.a</i>	BraGLN1.1_C1	<i>BraA.GLN1.1.a</i> (Bra028132; A04)
	BnaGLN1.1_C2; Y12460 (BnGSR2.2) ^b	<i>BnaC.GLN1.1.a</i>				
<i>AtGLN1.2</i> (At1g66200)	BnaGLN1.2_C1; X76736 (BnGSR1.1)	<i>BnaA.GLN1.2.a</i>	BolGLN1.2_C1; EU822334; EU822335	<i>BolC.GLN1.2.a</i>	BraGLN1.2_C1; EU499383; AY773089	<i>BraA.GLN1.2.a</i> (Bra039756; A02)
	BnaGLN1.2_C2; Y12459 (BnGSR1.2)	<i>BnaC.GLN1.2.a</i>				
<i>AtGLN1.3</i> (At3g17820)	BnaGLN1.3_C2; JX306693	<i>BnaA.GLN1.3.a</i>	BolGLN1.3_C1	<i>BolC.GLN1.3.a</i>	BraGLN1.3_C1	<i>BraA.GLN1.3.a</i> (Bra022247; A05)
	BnaGLN1.3_C1; JX306690 BnaGLN1.3_C4	<i>BnaC.GLN1.3.a</i> <i>BnaA.GLN1.3.b</i>				
	BnaGLN1.3_C3 BnaGLN1.3_C5; JX306694	<i>BnaC.GLN1.3.b</i> <i>BnaA.GLN1.3.c</i>			BraGLN1.3_C3 BraGLN1.3_C2 ^b	<i>BraA.GLN1.3.b</i> (Bra021276; A01) <i>BraA.GLN1.3.c</i> ; (Bra001686; A03) ^c
	BnaGLN1.3_C6	<i>BnaC.GLN1.3.c</i>				
<i>AtGLN1.4</i> (At5g16570)	BnaGLN1.4_C1; JX306697; JX306692 ^c	<i>BnaA.GLN1.4.a</i>	BolGLN1.4_C1	<i>BolC.GLN1.4.a</i>	BraGLN1.4_C1	<i>BraA.GLN1.4.a</i> (Bra023573; A02)
	BnaGLN1.4_C2; JX306695 BnaGLN1.4_C4; JX306700 ^c	<i>BnaC.GLN1.4.a</i> <i>BnaA.GLN1.4.b</i>				
	BnaGLN1.4_C3; JX306698 ^c	<i>BnaC.GLN1.4.b</i>			BraGLN1.4_C2	<i>BraA.GLN1.4.b</i> (Bra008612; A10)
<i>AtGLN1.5</i> (At1g48470)	BnaGLN1.5_C2	<i>BnaA.GLN1.5.a</i>	BolGLN1.4_C2	<i>BolC.GLN1.4.b</i>	BraGLN1.5_C1 ^b	<i>BraA.GLN1.5.a</i> (Bra018729; A06)
	BnaGLN1.5_C1; JX306691 ^b	<i>BnaC.GLN1.5.a</i>				

^a Annotation and localization on the linkage group from BRAD, the *Brassica rapa* genome sequencing project consortium ([Wang et al., 2011](#)).

^b Incomplete CDS sequence when compared with the *A. thaliana* CDS.

^c SNP insertion disrupting the ORF when compared with the *A. thaliana* CDS reference sequence and the BnaGLN1 contig.

Except for the four BnaGLN1.1_C1, BnaGLN1.1_C2, BnaGLN1.2_C1, and BnaGLN1.2_C2 contigs, no other *BnaGLN1* sequences have ever been described previously in the literature or reported in databases as glutamine synthetase gene products. While the BnaGLN1.1_C1, BnaGLN1.1_C2, BnaGLN1.2_C1, and BnaGLN1.2_C2, sequences have been identified as BnGSR2-1, BnGSR2-2, BnGSR1-1, and BnGSR1-2 mRNA, respectively ([Table 2](#); [Ochs et al., 1999](#)), contig analysis allowed the completion of the 5' end (untranslated region and coding sequence) of the BnGSR2-2 sequence that was previously missing ([Supplementary Data File S3](#) at *JXB* online).

Genetic localization of the BnaGLN1 loci on the A or C *Brassica* genome using PCR and gene name annotation

Phylogenetic analyses showed a strong relationship between each *BnaGLN1* gene and a gene from one or other of the progenitors *B. rapa* and *B. oleracea*, suggesting a common ancestral

origin on the A or C *Brassica* genome, respectively. The phylogenetic tree also shows that each *B. napus* sequence, related to one sequence from either progenitor, is also related to another *B. napus* sequence, itself related to the other progenitor. The two *B. napus* homeologous genes, the *B. rapa* and the *B. oleracea* genes, are thus defining in this way a homeology group (a, b, or c). It was found therefore that each of the *AtGLN1.1*, *AtGLN1.2*, and *AtGLN1.5* genes is related to one homeology group, while the *AtGLN1.3* and *AtGLN1.4* genes are related to three and two groups, respectively. It has to be noted that the b group related to *AtGLN1.3* is incomplete as no *BolGLN1.3* expressed sequence has been identified. Both the homeology groups and the *Brassica* genome were used to ascribe names to the *BnaGLN1* genes; thus, the genes are named *Bna*[A or C genome]*GLN1.x*[a, b, or c homeology group] according to [Ostergaard and King \(2008\)](#). A similar notation was used for the *BraGLN1* and *BolGLN1* genes ([Table 2](#)).

In order to identify the A or C genome origin, the potential localization of the *BnaGLN1* genes on linkage groups

and/or chromosomes known to arise from the A or C *Brassica* genomes was then investigated. Specific primer pairs were designed to localize each *BnaGLN1* gene (Supplementary Table S1 at JXB online). Five genes were mapped in this way on at least one of the three mapping populations available (Stellar×Drakar, Darmor×Samourai, and Darmor-bzh×Yudal), recording the presence/absence of polymorphism. In good agreement with the phylogenetic tree analysis, the three genes *BnaA.GLN1.3.c*, *BnaA.GLN1.3.a*, and *BnaA.GLN1.5.a* were localized on linkage groups associated with the A genome on chromosomes A03, A05, and A06, respectively. The two genes *BnaC.GLN1.2.a* and *BnaC.GLN1.3.c* were localized on linkage groups associated with the C genome on chromosomes C02 and C03 (Table 3; Supplementary Fig. S1 at JXB online).

For the other members of the *BnaGLN1* gene family, an attempt to assign the *BnaGLN1* genes to the A or C genomes using mapping populations was unsuccessful. Therefore, a panel of various Brassicaceae genotypes (Supplementary Fig. S2 at JXB online) was used in order to detect the *BolGLN1* and *BraGLN1* orthologous genes, using specific *BnaGLN1* primers (Supplementary Table S1). The number of genotypes used for each *Brassica* species was adjusted in order to take into account the possible allelic variations and to detect the presence/absence of polymorphism. Furthermore, additional lines carrying the full A genome and one or several *B. napus* C chromosomes were used in order to determine precisely the localization of the *BnaC.GLN1* genes (Auger et al., 2009) (Supplementary Fig. S3).

The results are summarized in Table 3 and detailed in Supplementary Figs S1, S2, and S3 at JXB online. In brief, with the exception of *BnaC.GLN1.4.b*, all the identified *BnaGLN1* genes were assigned to the A or C *Brassica* genome, confirming the two by two relationship of homology between them, which allowed them to be named according to their ancestral genome origin as recommended by Ostergaard and King (2008).

Identification of GLN1 genes of *Brassica rapa* and *Brassica napus* genomes

The recently sequenced and annotated *B. rapa* genome (BRAD; Cheng et al., 2011) was used to perform BLAST searches and sequence alignments using the *BraGLN1* contig sequences identified here. Analysis revealed eight annotated *BraGLN1* genes (Table 2). Alignments between *BraGLN1* gene sequences and contigs revealed potential splicing variants. Indeed, the CDS deduced from the *BraGLN1.3_C2* contig appeared incomplete at the 5' end. The most highly similar Bra001686 annotated gene on the A03 chromosome also appeared incomplete when compared with the *AtGLN1.3* CDS, as it is missing the first exon. The BLAST search on A03 chromosome v1.1 revealed the presence of a sequence highly similar to the *AtGLN1.3* first exon, 4kb upstream of the identified Bra001686 sequence (bp 17 854 801 to 17 854 849). According to the BRAD annotation, this inserted region has been described as an long terminal repeat (LTR) transposon of 3746bp on the minus strand. The identified

Table 3. Genetic mapping of *BnaGLN1* genes

Mapping was performed using specific primers for each contig and different mapping populations or genotypes for *B. napus*, *B. oleracea*, and *B. rapa*. Linkage groups used to assign each gene to A or C genomes are presented.

<i>BnaGLN1</i>		Mapping population	Linkage group (previous name)	LOD	Upstream marker		Downstream marker	
Gene name	Contig name				Name	Distance (cM)	Name	Distance (cM)
<i>BnaA.GLN1.1.a</i>	BnaGLN1.1_C1	Panel ^a	A					
<i>BnaC.GLN1.1.a</i>	BnaGLN1.1_C2	Add ^b	C06					
<i>BnaA.GLN1.2.a</i>	BnaGLN1.2_C1	Panel ^a	A					
<i>BnaC.GLN1.2.a</i>	BnaGLN1.2_C2	SD ^c	C02 (SD02)	13.5	PFM504	9.1	J15.1200	9.1
<i>BnaA.GLN1.3.a</i>	BnaGLN1.3_C2	DS ^d	A05 (DS19)	17	E1M4.21	2.7	BN614	13.5
<i>BnaC.GLN1.3.a</i>	BnaGLN1.3_C1	Add ^b	C05					
<i>BnaA.GLN1.3.b</i>	BnaGLN1.3_C4	Panel ^a	A					
<i>BnaC.GLN1.3.b</i>	BnaGLN1.3_C3	Add ^b	C01					
<i>BnaA.GLN1.3.c</i>	BnaGLN1.3_C5	DS ^d	A03 (DS04)	16.1	PFM 193	3.8	BN466	7.9
<i>BnaC.GLN1.3.c</i>	BnaGLN1.3_C6	SD ^c , add ^b	C03 (SD717)	25.9	BN04C	1.3	IGF0193c	2.2
<i>BnaA.GLN1.4.a</i>	BnaGLN1.4_C1	Panel ^a	A					
<i>BnaC.GLN1.4.a</i>	BnaGLN1.4_C2	Panel ^a	C					
<i>BnaA.GLN1.4.b</i>	BnaGLN1.4_C4	Panel ^a	A					
<i>BnaC.GLN1.4.b</i>	BnaGLN1.4_C3							
<i>BnaA.GLN1.5.a</i>	BnaGLN1.5_C2	DY ^e	A06 (DY06)	8.9	nr	nr	BN57463	21.8
<i>BnaC.GLN1.5.a</i>	BnaGLN1.5_C1	Panel ^a	C					

^a Panel of *B. napus*, *B. oleracea*, and *B. rapa* genotypes.

^b Monosomic and polysomic addition lines obtained from the Darmor-bzh×C1.3 cross.

^c Stellar×Drakar mapping population.

^d Darmor×Smourai mapping population.

^e Darmor-bzh×Yudal mapping population.

B. rapa EST (EX089134) that allowed identification of the 5' region of the BraGLN1.3_C2 contig starts in the transposon region and continues into the first identified exon of Bra001686 which corresponds to the second *AtGLN1.3* exon.

The sequencing programme performed at URGV allowed identification of *BnaGLN1* sequences in the *B. napus* Darmorbzh genome (SEQ-POLYNAP, ANR-09-GENM-021). The BraGLN1 protein sequences were deduced from the identified *BraGLN1* genes using the BRAD tool, and used to search the database of protein sequences built from *B. napus* genomic sequence analysis (unpublished data). From the BnaGLN1 protein sequences identified, genomic sequences were recovered (Supplementary Data File S4 at JXB online). Interestingly, 16 putative *BnaGLN1* genes and two putative *BnaGSL* genes (coding for the GS2 isoform) were found. The 16 *BnaGLN1* genomic sequences (Supplementary Data File S4) were used to analyse similarities with the *B. napus* contigs and to create a phylogenetic tree (Supplementary Fig. S4). Interestingly, each genomic sequence was closely associated with one contig sequence, suggesting that all the genes with the 16 *BnaGLN1* contigs had been found. The deduced mRNA sequences (Supplementary Data File S5), obtained using FGGENESH software available on the SoftBerry website (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenesh&group=programs&subgroup=gfind>), showed very a high similarity with the contig sequences (Table 4) and allowed the gene structures to be deduced (Fig. 2). Except for BnaGLN1.3_C5 and BnaGLN1.3_C6,

similarities between mRNA and associated contigs were near 100% (Table 4). Knowing that contig sequences and mRNA sequences are obtained from different *B. napus* genotypes (Supplementary Data File S1), this indicates that there is almost no polymorphism between the different *BnaGLN1* coding sequences regarding the various genotypes of *B. napus* used for genome and EST sequencing. The *BnaGLN1* genes contained between seven and 12 exons. *GLN1.4* and *GLN1.5* genes have the same number of exons in both *B. napus* and *Arabidopsis* (Table 4). For the other *GLN1* genes, exon numbers are different between *Arabidopsis* and *B. napus*, but quite close; for example, *AtGLN1.3* and *BnaGLN1.3* contain fewer exons than other *AtGLN1* and *BnaGLN1* genes.

BnaGLN1 protein sequence conservation

Protein sequences of the BnaGLN1 family deduced from the coding sequences of contigs or from the deduced mRNA are similar. The BnaGLN1 proteins share between 93% and 96.6% identity with the AtGLN1 proteins encoded by their respective orthologous genes (Table 1). Within each homeology group, the A and C BnaGLN1 proteins share 98.3–100% identity.

In all BnaGLN1 protein sequences, two conserved pfam domains specific to glutamine synthetase enzymes (pfam 03951 and pfam 00120) were identified (Fig. 3). The residues involved in the ammonium/glutamate-binding pocket (Eisenberg *et al.*, 2000) are also strictly conserved. In contrast,

Table 4. Comparison between contigs of ESTs and the mRNA sequences deduced from the *BnaGLN1* genomic sequences

Comparison of nucleotide length (bp), % similarities, and exon numbers between the *B. napus* contigs and the mRNA sequences (Supplementary Data File S5 at JXB online) deduced from the *BnaGLN1* genomic sequences (Supplementary Data File S4). Similarities were estimated using BLAST (NCBI) and exons using FGGENESH software at the SoftBerry website.

Gene name	Contig name	Contig length (bp)	Deduced mRNA name	Putative mRNA length (bp)	% similarity between contig and mRNA	No. of exons
<i>AtGLN1.1</i>				1494		9
<i>BnaA.GLN1.1.a</i>	BnaGLN1.1_C1	1374	mRNA.BnaA.GLN1.1.a	1746	100	11
<i>BnaC.GLN1.1.a</i>	BnaGLN1.1_C2	1367	mRNA.BnaC.GLN1.1.a	1474	100	11
<i>AtGLN1.2</i>				1499		10
<i>BnaA.GLN1.2.a</i>	BnaGLN1.2_C1	1430	mRNA.BnaA.GLN1.2.a	2587	100	9
<i>BnaC.GLN1.2.a</i>	BnaGLN1.2_C2	1431	mRNA.BnaC.GLN1.2.a	2123	99	11
<i>AtGLN1.3</i>				1341		9
<i>BnaA.GLN1.3.a</i>	BnaGLN1.3_C2	1336	mRNA.BnaA.GLN1.3.a	2012	100	8
<i>BnaC.GLN1.3.a</i>	BnaGLN1.3_C1	1487	mRNA.BnaC.GLN1.3.a	1555	99	8
<i>BnaA.GLN1.3.b</i>	BnaGLN1.3_C4	1273	mRNA.BnaA.GLN1.3.b	2051	99	7
<i>BnaC.GLN1.3.b</i>	BnaGLN1.3_C3	1275	mRNA.BnaC.GLN1.3.b	1803	100	7
<i>BnaA.GLN1.3.c</i>	BnaGLN1.3_C5	1253	mRNA.BnaA.GLN1.3.c	1840	96	9
<i>BnaC.GLN1.3.c</i>	BnaGLN1.3_C6	1245	mRNA.BnaC.GLN1.3.c	1761	96	9
<i>AtGLN1.4</i>				1269		12
<i>BnaA.GLN1.4.a</i>	BnaGLN1.4_C1	1273	mRNA.BnaA.GLN1.4.a	1461	100	12
<i>BnaC.GLN1.4.a</i>	BnaGLN1.4_C2	1259	mRNA.BnaC.GLN1.4.a	1415	99	12
<i>BnaA.GLN1.4.b</i>	BnaGLN1.4_C4	1102	mRNA.BnaA.GLN1.4.b	2582	99	12
<i>BnaC.GLN1.4.b</i>	BnaGLN1.4_C3	1123	mRNA.BnaC.GLN1.4.b	1494	100	12
<i>AtGLN1.5</i>				1307		10
<i>BnaA.GLN1.5.a</i>	BnaGLN1.5_C2	1392	mRNA.BnaA.GLN1.5.a	1329	99	10
<i>BnaC.GLN1.5.a</i>	BnaGLN1.5_C1	1380	mRNA.BnaC.GLN1.5.a	1349	100	10



Fig. 2. Structure of *BnaGLN1* genes. For each *BnaGLN1* gene, the length of the 5' and 3' untranslated regions (UTRs) (white boxes), exons (black boxes), and introns (black lines) is represented by a number corresponding to base pairs.

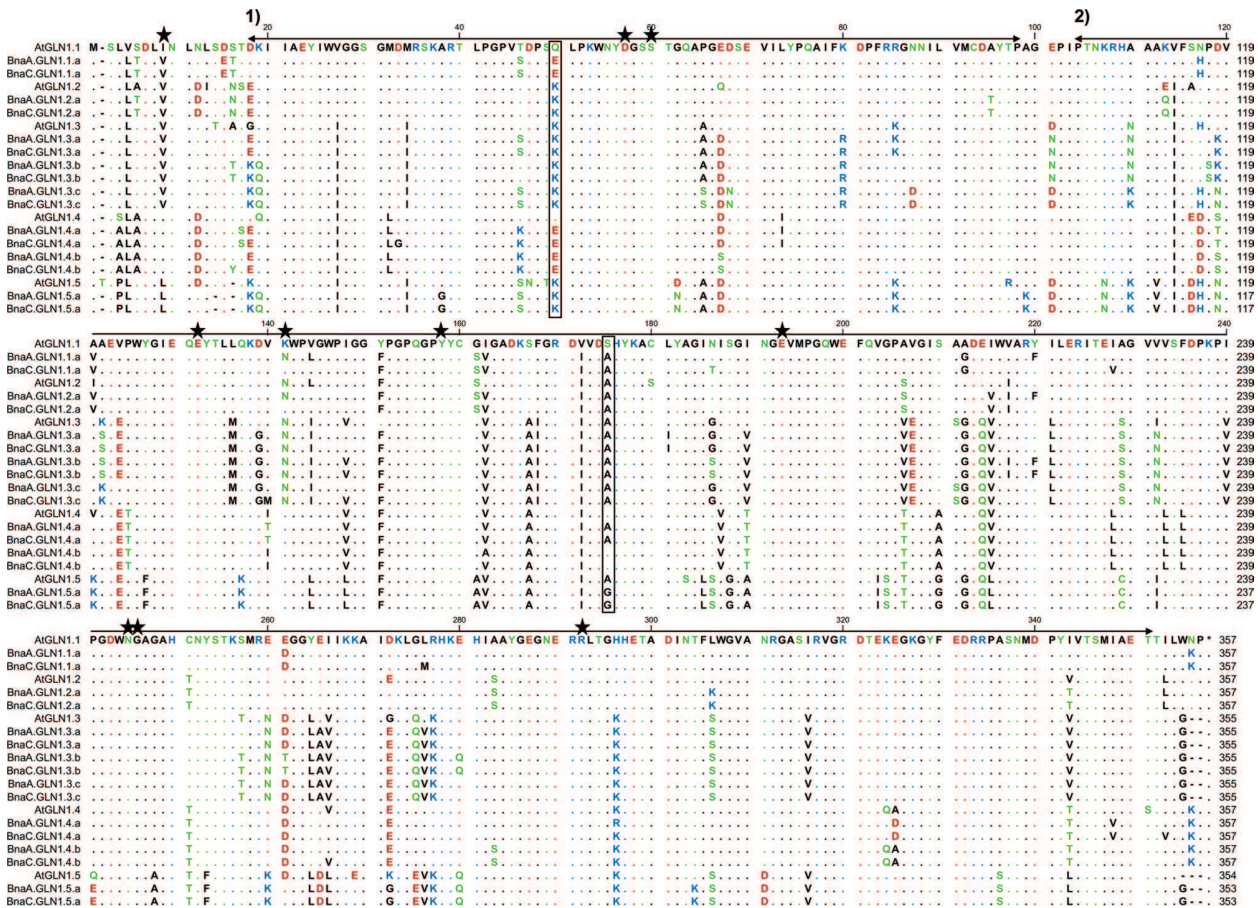


Fig. 3. Alignment of *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana* GS1 proteins. Protein sequences were deduced from DNA coding sequences and aligned using Clustal. Stars indicate residues involved in the ammonium/glutamate-binding pocket (Eisenberg *et al.*, 2000). Boxes indicate residues involved in ammonium affinity properties (Ishiyama *et al.*, 2006). Arrows indicate conserved domains (1) pfam 03951 Gln-synt_N glutamine synthetase bet-Gasp domain; and (2) pfam 00120 gln-synt_C catalytic domain. Residues are coloured according to their polarity properties (neutral non-polar as black, neutral polar as green, acidic as red, and basic as blue).

the polar amino acids Q49 and S174, shown to be involved in the ammonium high affinity properties of AtGLN1.1 and AtGLN1.4 (Ishiyama *et al.*, 2006), are not strictly conserved in all the BnaGLN1.1 and BnaGLN1.4 proteins. The polar Q49 was converted into an acidic glutamate E49 in all the BnaGLN1.1 and BnaGLN1.4 sequences, and the S174 is conserved only in the two BnaGLN1.4.b sequences but was converted into an A174 in the BnaGLN1.4.a and BnaGLN1.1.a sequences. Depending on the effect of such amino acid modifications, it might be possible that ammonium affinity properties have not been conserved within the BnaGLN1.1 and BnaGLN1.4 protein families. In contrast, the residues K49 and A174 present in the low affinity enzymes AtGLN1.2 and AtGLN1.3 are conserved in all the BnaGLN1.2 and BnaGLN1.3 protein sequences, suggesting the conservation of the low ammonium affinity properties in those two protein families (Fig. 3).

Expression of BnaGLN1 genes is modified depending on the nitrogen regime and leaf senescence

A first analysis of EST distribution between libraries and BnaGLN1 contigs led to the conclusion that *BnaGLN1* genes

are probably differentially expressed according to tissue and developmental stage (Supplementary Data File S1 at JXB online).

The *BnaGLN1* gene expression was monitored at the vegetative stage measuring transcript levels by quantitative real-time RT-PCR in samples of taproot, crown, limbs, and veins of plants grown under low or high nitrate conditions. Plants grown under low or high nitrate conditions grew 13 and 17 leaves, respectively. F_v/F_m and SPAD measurements on all the leaf ranks (numbered from the bottom leaf to the top leaf) were done to estimate the relative leaf senescence status of each leaf. From both SPAD and F_v/F_m as senescence markers, six leaves were selected from each nitrate condition presenting differential senescence levels to perform further experiments (Fig. 4). Leaves of rank 3, 5, 6, 7, 9, and 11 were harvested on plants grown under low nitrate conditions. Leaves 3, 5, 6, 9, 12, and 15 were harvested on plants grown under high nitrate conditions. To simplify the presentation of further results, the collected leaf ranks were renamed 1, 2, 3, 4, 5, and 6, respectively, with 1 designating the bottom-most and oldest collected leaf and 6 the youngest collected leaf. Leaves dissected as limbs, and primary and secondary veins were used to measure *BnaGLN1.1* gene expression levels in the different

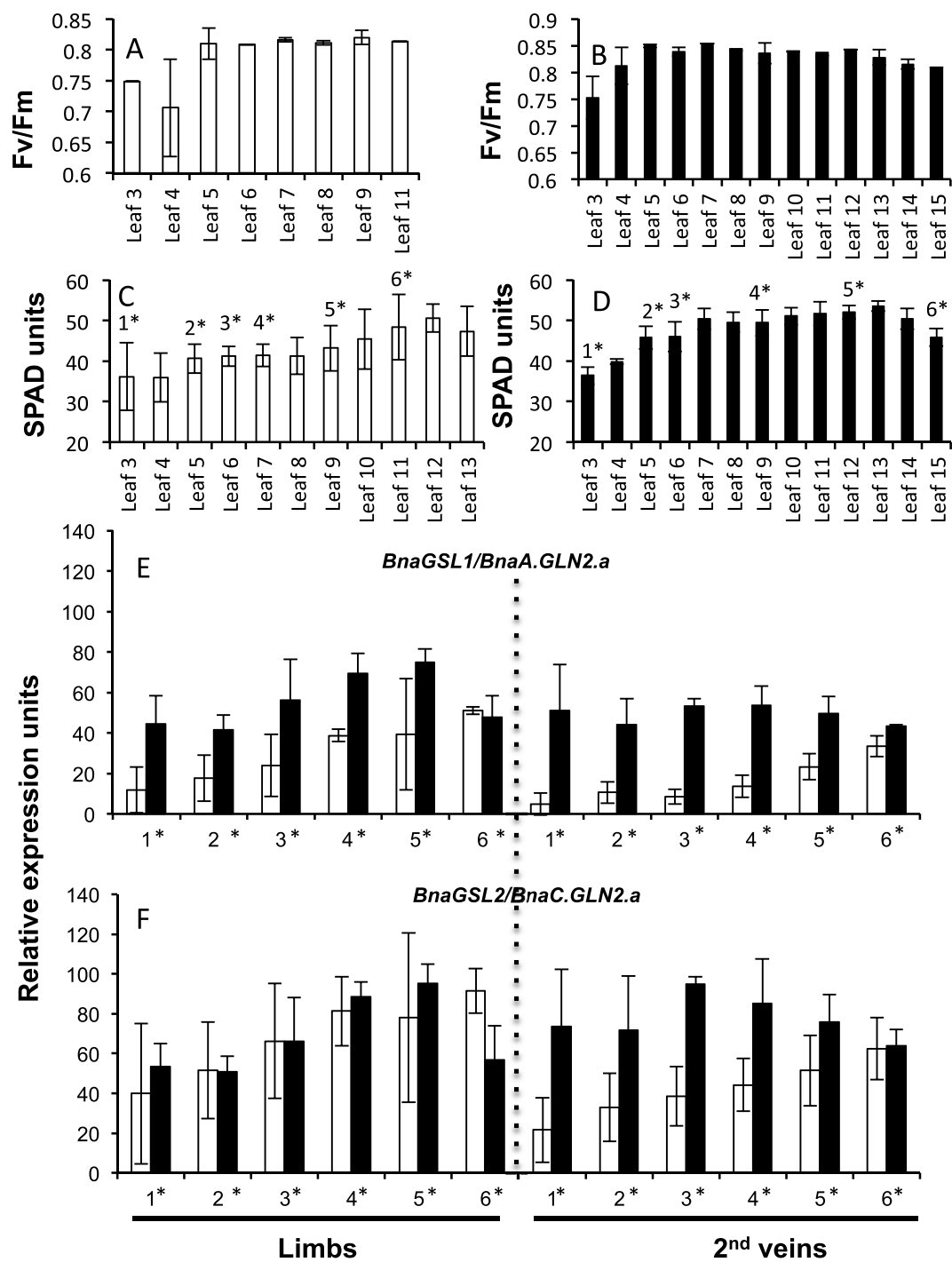


Fig. 4. Leaf senescence markers on vegetative *B. napus* plants. F_v/F_m photosystem II capacity (A, B) and chlorophyll relative content (C, D) were monitored at the vegetative stage in all the leaf ranks of four *B. napus* plants grown under low (white bars) or high (black bars) nitrate conditions. The expression of the *BnaA.GLN2.a* and *BnaC.GLN2.a* marker genes was quantified (E, F) on selected leaf ranks (*) and confirmed differential senescence symptoms. Mean and standard deviation of four plant repeats are shown.

tissues. In addition to *BnaGLN1.1* expression, the expression of *BnaGSL1* and *BnaGSL2* encoding the chloroplastic GS2 isoenzymes was also monitored and used as a control for leaf senescence as it is known that genes encoding GS2 isoenzymes are down-regulated with leaf ageing in all the plant species studied so far (Masclaux-Daubresse et al., 2008). *BnaGSL1* and *BnaGSL2* expression levels confirmed the

differential senescence phenotype of the chosen leaf ranks. Leaves 1, 2, and 3 can be considered as senescing leaves, 4 and 5 as mature leaves, and 6 as a young leaf according to Masclaux et al. (2000) (Fig. 4E, F).

Genes that are preferentially expressed under high or low nitrate conditions were identified. The results showed that regarding the N regime, all the members of the same gene family

respond similarly, with a few exceptions from the *BnaGLN1.3* family. It was observed that all the members of the *BnaGLN1.1* and *BnaGLN1.4* gene families were significantly induced under low nitrate conditions compared with high nitrate. This was observed in limbs, secondary veins (Fig. 5A–F), and also in primary veins for some *BnaGLN1.4* genes (Supplementary Fig. S5E–H at JXB online). Induction under low nitrate conditions was also clearly observed in the taproot and crown (Fig. 6A, B; E–H). In contrast, the two *BnaGLN1.2* genes were significantly more expressed under high nitrate conditions in leaf limbs and veins but not in the taproot and crown (Fig. 5M, N; C, D). Finally no difference was observed in the expression of the *BnaGLN1.3* and *BnaGLN1.5* families in leaf limbs or veins between the high nitrate and low nitrate conditions (Fig. 5G–L). Surprisingly, all the *BnaGLN1.3* genes are significantly induced under low nitrate conditions in the taproot but not in crown tissue (Fig. 6I–M). Therefore, N-dependent regulation might be different in the root and shoot.

BnaGLN1 genes also appeared to be differentially expressed depending on leaf ageing and senescence. The two *BnaGLN1.1* genes and the four *BnaGLN1.4* genes were significantly induced in leaf limbs and veins with ageing and during senescence independently of nitrate conditions (Fig. 5A–F; Supplementary Fig. S5B, E–H at JXB online). Cumulated expression of the *BnaA.GLN1.5.a/BnaC.GLN1.5.a* genes (Fig. 5L) also increased with leaf ageing and senescence in limbs and veins of plants grown under low and high nitrate conditions. In contrast, senescence triggers an opposite effect on the mRNA level of the two *BnaGLN1.2* genes, especially under low nitrate nutrition (Fig. 5M, N). The effect of senescence was less evident under high nitrate conditions in limbs and veins due to the already high *BnaGLN1.2* expression in mature leaves. In these leaves, expression profiles are biphasic, increasing from young to mature leaves then decreasing in senescing leaves. Profiles are more complex in the *BnaGLN1.3* family since the expression of *BnaC.GLN1.3.a*, *BnaA.GLN1.3.b*, and *BnaC.GLN1.3.b* (Fig. 5H–J) is repressed with leaf ageing in limbs and veins, while the expression of *BnaA.GLN1.3.a* (Fig. 5G) and cumulated *BnaA.GLN1.3.c/BnaC.GLN1.3.c* (Fig. 5K) is increased with ageing in limbs.

These results show that within all the *BnaGLN1* families except *BnaGLN1.3*, all members show similar expression levels. The four *BnaGLN1.4* genes are the most highly expressed in all the tissues studied. *BnaGLN1.4* gene expression is four times higher than that of the *BnaGLN1.1* genes and 20 times higher than that of *BnaGLN1.2*. The expression level of all the *BnaGLN1.3* and *BnaGLN1.5* genes is much lower, except that of the cumulated *BnaGLN1.3c* genes that reach a similar level to *BnaGLN1.2*. Table 5 summarizes the N and senescence effects observed on the *BnaGLN1* expression levels.

BnaGLN1 genes are differentially expressed at the reproductive stage depending on plant organs or leaf ageing

In order to monitor *BnaGLN1* gene expression at the reproductive stage, plants were grown in field conditions under low or high N regimes. Two leaf ranks (young top leaf and old

bottom leaf) and the two corresponding stem sections (also referred to hereafter as young and old) were collected at flowering and during grain filling.

Globally, effects of N limitation on *BnaGLN1* expression were similar to those found at the vegetative stage, except that the magnitude of gene repression or induction was lower than that observed at the vegetative stage (Supplementary Table S5 at JXB online).

Figure 7 reports the effect of senescence on the expression of the *BnaGLN1* genes in leaves and stems of plants grown under a sufficient N regime. As a control of leaf senescence stages, the *BnaGSL1* and *BnaGSL2* genes are significantly more highly expressed in the young tissues than in older tissues (Fig. 7N, O). There was a sharp decrease in *BnaGSL* gene expression at the flowering stage, while at the seed filling stage the magnitude of *BnaGSL* repression was much lower but still significant.

As observed at the vegetative stage, the *BnaGLN1.1* genes were up regulated with leaf and stem senescence, but this was only observed at the flowering stage (Fig. 7A, B). During seed filling, expression in leaves and stems was higher than during flowering, showing an effect of plant ageing. However, no difference was observed between the young and old leaves, suggesting that both types of leaves had become senescent between flowering and seed filling. The two *BnaGLN1.1* genes were expressed more highly in leaf blades than in stems at both the flowering and seed filling stages. Similarly the *BnaGLN1.2* genes were more expressed in leaf blades than in stems (Fig. 7C, D). The effect of senescence on *BnaGLN1.2* genes was opposite to the effect observed on *BnaGLN1.1* genes. *BnaGLN1.2* expression decreased 2- to 3-fold in old leaf blades and old stems compared with young leaf blades and young stems, respectively. The biphasic profile obtained for *BnaA.GLN1.2* at the vegetative stage was also observed at the flowering stage (data not shown). As observed with the *BnaGLN1.1* genes, the effect of senescence was no more significant at seed filling.

Among the four *BnaGLN1.4* genes, only *BnaA.GLN1.4.a* and *BnaC.GLN1.4.a* shared similar expression profiles (Fig. 7E–H). They are preferentially expressed in leaf blades rather than in stems. In contrast to the vegetative stage, *BnaA.GLN1.4.a* and *BnaC.GLN1.4.a* tend to be repressed by senescence in leaf blades but induced by senescence in stems. This trend was especially significant at the flowering stage. In contrast, *BnaA.GLN1.4.b* was induced by senescence in leaf blades and stems at the flowering stage but repressed during seed filling (Fig. 7G). Finally, *BnaC.GLN1.4.b* expression was higher in leaf blades than in stems and was repressed by senescence at the flowering stage, similarly to the two *BnaA.GLN1.4.a* and *BnaC.GLN1.4.a* genes (Fig. 7H). In contrast to the vegetative stage, the members of the *BnaGLN1.4* family have developed specificities and are differentially expressed at the flowering and seed filling stages. It is likely that they have different roles and influences on N metabolism after flowering.

Among the *BnaGLN1.3* members, similar profiles were observed for *BnaA.GLN1.3.a*, *BnaA.GLN1.3.b*, and *BnaC.GLN1.3.b* (Fig. 7I, K, L). These three genes are

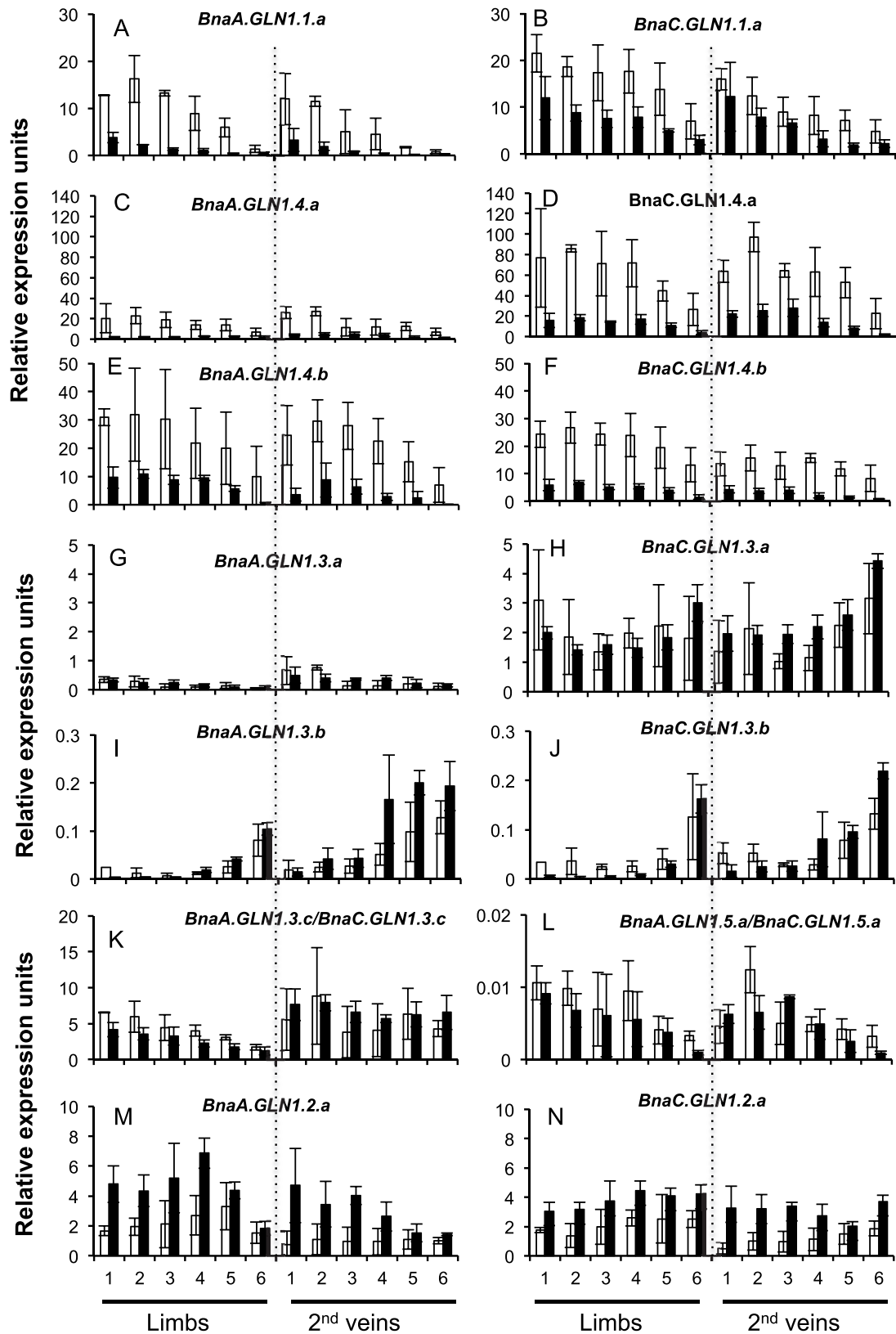


Fig. 5. Expression of *BnaGLN1* genes is modified depending on nitrate availability and leaf ageing. The relative expression level of *BnaGLN1* genes was monitored in limbs and secondary veins of six leaf ranks harvested on vegetative plants grown under low (white bars) or high (black bars) nitrate conditions. Leaf ranks represented as number 1 (bottom and older leaf) to 6 (top and younger leaf) showed differential senescence symptoms. Mean and standard deviation of four plant repeats are shown.

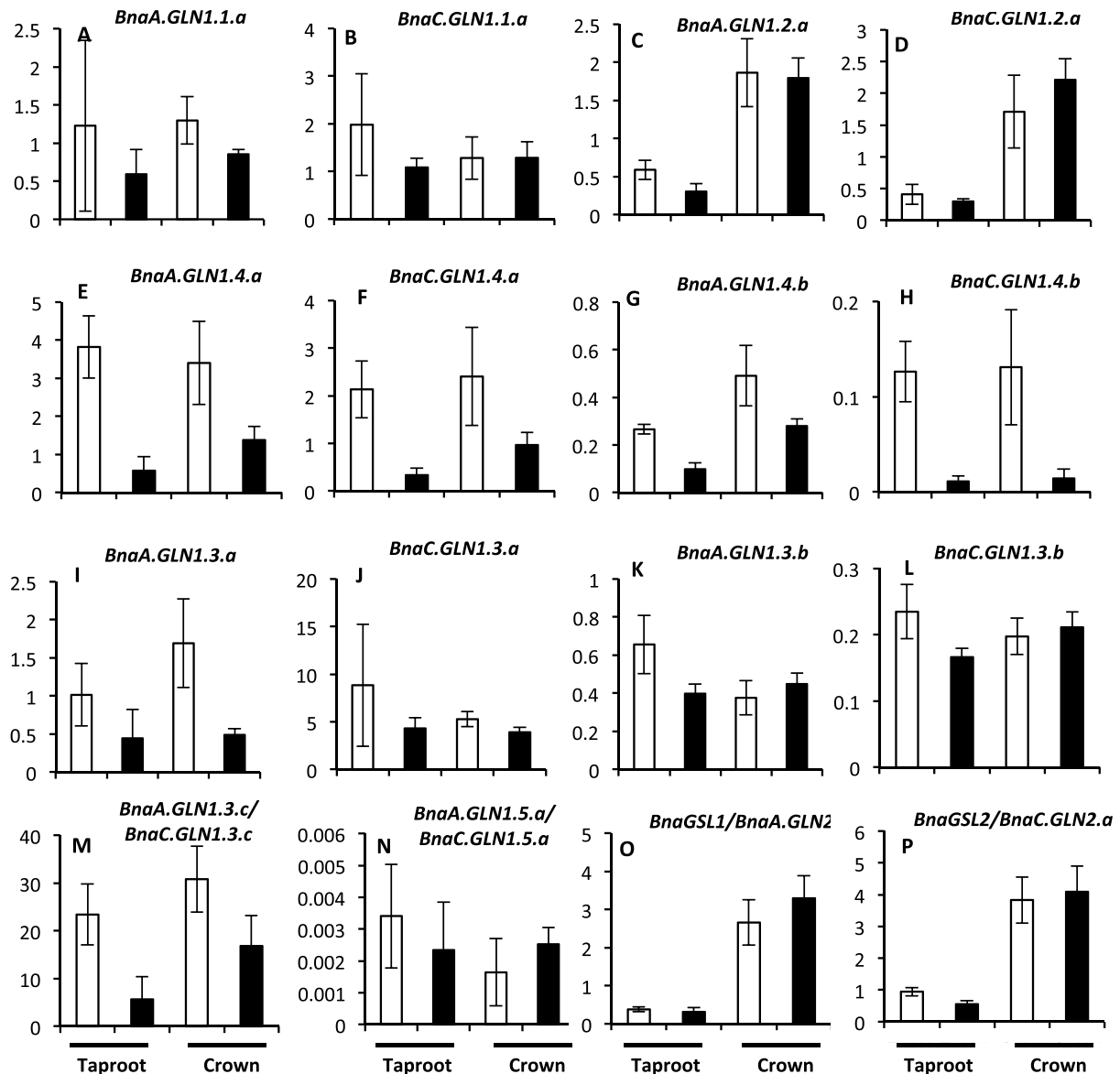


Fig. 6. Expression of *BnaGLN1* genes is modified depending on nitrate availability in the taproot and crown of vegetative *B. napus* plants. The relative expression level of *BnaGLN1* genes was monitored at the vegetative stage in the taproot and crown of four plants grown under low (white bars) or high (black bars) nitrate conditions. Mean and standard deviation of four plant repeats are shown.

down-regulated in old leaves and stems compared with young leaves at the flowering stage. However, their expression increased sharply in old limbs at the seed filling stage. The other *BnaC.GLN1.3.a* and *BnaA.GLN1.3.c/BnaC.GLN1.3.c* expression profiles did not show any modification associated with leaf or stem senescence (Fig. 7J, M). All the *BnaGLN1.3* genes appeared to be more highly expressed in stems than in leaves, especially at the flowering stage.

It was not possible to measure *BnaA.GLN1.5.c/BnaC.GLN1.5.c* gene expression, possibly due to the very low expression level in vegetative tissues that cannot be accurately measured in field-grown plants.

Results obtained at the flowering and seed filling stages confirm results from the vegetative stage. *BnaGLN1* genes

are generally similarly regulated according to their orthology group, although exceptions were observed particularly at the seed filling stage, such as with *BnaA.GLN1.4.b* and *BnaC.GLN1.3.a* (Fig. 7G, J).

Discussion

Glutamine synthetase is a key enzyme of N metabolism involved in ammonium assimilation and remobilization. Recent studies highlight the important role of GS1 cytosolic isoenzymes for N management linked to yield establishment and seed filling in monocotyledonous crops (Tabuchi *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2006; Bernard and Habash, 2009; Swarbreck *et al.*, 2011). The GS1-coding genes are therefore

Table 5. Nitrogen and senescence effects observed on the *BnaGLN1* expression levels at vegetative, flowering and seed filling stages

Significant positive and negative effects of nitrogen limitation (A) and ageing (B) on the expression of the *BnaGLN1* genes recorded at vegetative, flowering, and seed filling stages are reported. The average level of expression of each *BnaGLN1* gene as the mean of the data recorded in all the samples analysed is reported in column 2 (relative to the *BnaX.SAND* gene).

Gene(s) name	Mean relative expression level	(A) Nitrogen limitation effect										(B) Age effect							
		Vegetative stage					Flowering		Seed filling			Vegetative stage				Flowering		Seed filling	
		Limb	Primary vein	Secondary vein	Tap root	Crown	Limb	Stem	Limb	Stem	Limb	Primary vein	Secondary vein	Limb	Stem	Limb	Stem		
<i>BnaA.GLN1.1.a</i>	4.59	+		+	+	+		+	+	+		+		+		+	+		
<i>BnaC.GLN1.1.a</i>	9.64	+	+	+	+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+		
<i>BnaA.GLN1.2.a</i>	2.69	−	−	−	+		−	−	−	+		+	+	+	+	+	+		
<i>BnaC.GLN1.2.a</i>	2.59	−	−	−		−	−	−	−		+			+		+			
<i>BnaA.GLN1.3.a</i>	0.26				+	+				+		+		+		+	+		
<i>BnaC.GLN1.3.a</i>	2.07				+	+				+									
<i>BnaA.GLN1.3.b</i>	0.06		−	−	+			−	−	+		−		−		−	−		
<i>BnaC.GLN1.3.b</i>	0.06		−	−	+			−	−	+		−		−		−	−		
<i>Bna.GLN1.3.c^a</i>	4.82				+	+				+		+							
<i>BnaA.GLN1.4.a</i>	9.54	+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+		
<i>BnaC.GLN1.4.a</i>	38.29	+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+		
<i>BnaA.GLN1.4.b</i>	14.18	+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+		
<i>BnaC.GLN1.4.b</i>	10.65	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+		+		
<i>Bna.GLN1.5.a^a</i>	<0.01											+		+					

^aRelative expression level associated to both A and C genes.

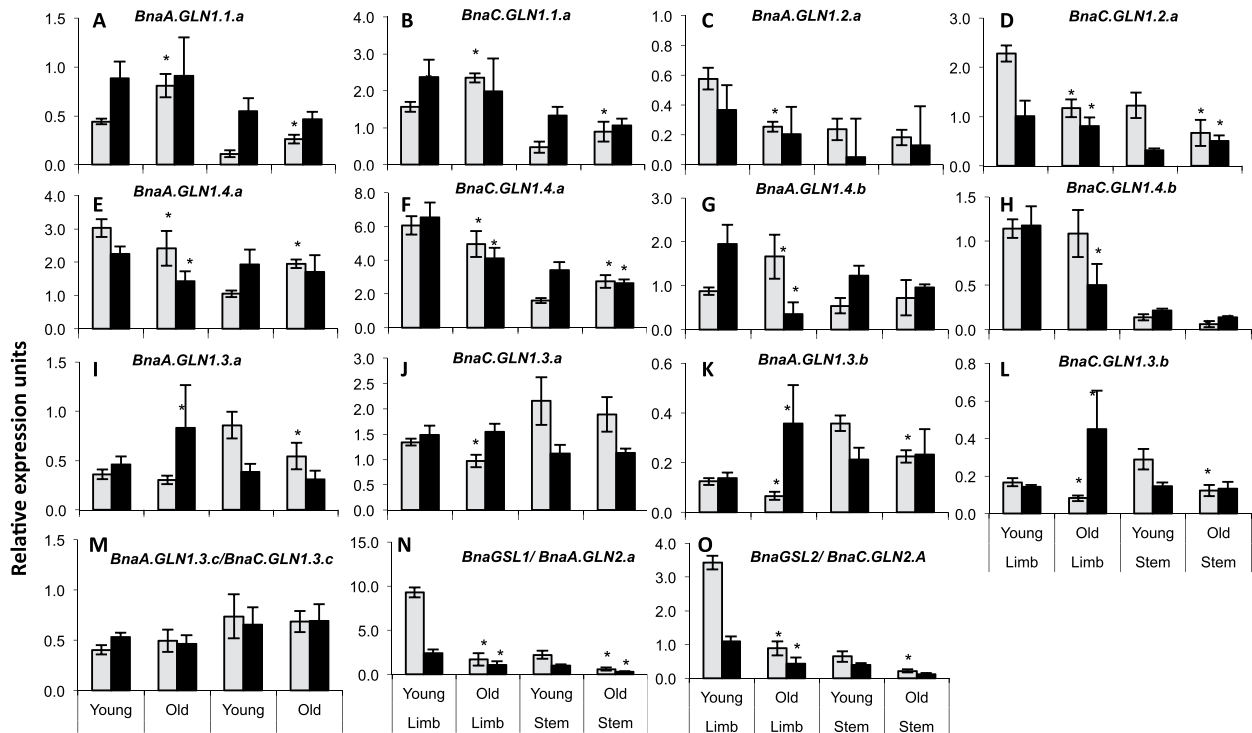


Fig. 7. *BnaGLN1* genes are differentially expressed depending on flowering or seed filling stages and leaf age. The relative expression level of *BnaGLN1* genes was monitored in young and old leaves of plants grown in the field and supplemented with nitrogen. Leaf limbs and stems were collected at flowering (white bars) and seed filling (black bars) stages. Mean and standard deviation of four plant repeats are shown. * indicates significant difference (Student's *t*-test, $P < 0.05$) between flowering and seed filling stages.

good candidates for improving yield traits and grain quality (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008). The complexity of studying glutamine synthetases arises from the fact that two isoenzymes exist, one in the chloroplast and the other in the cytosol, and that several isoforms exist for the cytosolic enzyme. The numerous isoforms are encoded by a multigenic family, and the five *GLN1* genes in *A. thaliana* are likely to present different roles depending on plant organs and nitrate availability in the soil (Lothier *et al.*, 2011). Similarly the five maize *GLN1* genes do not participate equally in N management at the whole-plant level (Martin *et al.*, 2006; Hirel *et al.*, 2007). The aim of this study was to identify the whole *BnaGLN1* gene family and to characterize the expression of the different genes depending on nitrate availability as well as depending on ageing and leaf and stem tissue senescence.

Using the sequences obtained from EST libraries and genome sequencing, a total of 16 genes belonging to the *BnaGLN1* family, eight genes from each of the A and C genomes, were found. In accordance with the history of *B. napus* genome formation (Nagaharu, 1935), it was found that each *BnaGLN1* gene is closely related to a *BraA.GLN1* or *BolC.GLN1* gene depending on its A or C genome location. Therefore, it can be stated with confidence that all the *GLN1.1* genes of *B. napus* have been described in this report. Sequence analyses also showed that *B. napus* coding

sequences are highly conserved between the A and C genomes and also between *B. napus* genotypes. The level of sequence divergence observed in the *BnaGLN1* family is between 0.9% and 2.9% SNPs (single nucleotide polymorphisms) in CDS, which is less than the preliminary observation showing sequence divergences of ~3–5% SNPs in CDS from SLR1 (Inaba and Nishio, 2002).

It is well known that *B. napus* shows a high degree of collinearity to its diploid progenitors *B. rapa* and *B. oleracea* (Rana *et al.*, 2004). Many studies have investigated the segmental structure of the *Brassica* genomes and led to the identification and genetic mapping of synteny blocks between *A. thaliana* and the *Brassica* genomes (Parkin *et al.*, 2005; Schranz *et al.*, 2006; J. Wang *et al.*, 2011). The number of potential *BnaGLN1* genes and their localization on linkage groups can then be predicted depending on the number of times the blocks are replicated and on their localization on each *B. napus* linkage group. According to the whole-genome triplication event that occurred in Brassicaceae genome species after divergence from *Arabidopsis* (Lysak *et al.*, 2005; Parkin *et al.*, 2005), and the recent hybridization between *B. rapa* and *B. oleracea* leading to the appearance of *B. napus*, each *AtGLN1* gene could have been found in triplicate in each A and C genome from *B. napus* to form three pairs of homeologous genes. From EST and genome sequence analyses, it is revealed here that

only one homeology group exists for *AtGLN1.1*, *AtGLN1.2*, and *AtGLN1.5* and two groups for *AtGLN1.4*. *AtGLN1.3* is the only *GLN1* gene for which the six *BnaGLN1* orthologous genes were retained in the *B. napus* genome. This illustrates the massive gene loss that occurred in the *Brassica* lineage after the whole-genome triplication event. Indeed, using *A. thaliana* as an outgroup, Town *et al.* (2006) found that 35% of genes inferred to be present when genome triplication occurred in the *Brassica* lineage have been lost in *B. oleracea*. Similarly, whole-genome analysis of *B. rapa* revealed a high rate of gene loss, from 30% to 64% depending on the degree of fractionation of the region considered (X. Wang *et al.*, 2011). *BnaGLN1* families are a good example of this.

With the exception of *BnaGLN1.4.b* genes, the present study points out that pairs of *BnaGLN1* homeologous genes share very similar transcription profiles. Furthermore, within one orthology group, when several groups of homeologues were retained, paralogous genes conserved similar expression profiles (*BnaGLN1.3* and *BnaGLN1.4*). This suggests that coding but also regulatory sequences were essentially conserved after genome merging of *B. napus* progenitors, but also after the whole-genome duplication (WGD) and diploidization events that occurred in the *Brassica* lineage after the divergence from the *Arabidopsis* genus. WGD is generally thought to provide raw material for gene neo- and subfunctionalization, extending resilience to deleterious mutations, increasing the net speciation rate and species richness (Soltis *et al.*, 2009), as well as providing the adaptive advantage for colonizing harsh and unstable environments (Franzke *et al.*, 2011). On the other hand, maintenance of redundancy can confer robustness against mutations (De Smet and Van de Peer, 2012) and/or a selective advantage in increasing the abundance of encoded proteins (Bekaert *et al.*, 2011). As GS1 is an essential enzyme of primary N metabolism, linked to central carbon metabolism via the GS/GOGAT cycle that might also play a role in the adaptation of plant to nutrient deficiency and pathogen attack (Brau *et al.*, 2011; Seifi *et al.*, 2013), maintenance of multicopy of *GLN1* could confer robustness against mutations. Nevertheless, *GLN1* expression profiles have not been exhaustively investigated and there might be particular environmental or developmental conditions allowing the differentiation of expression profiles between homeologous and/or paralogous genes. Partially overlapping profiles could provide robustness against mutations, but also adaptive advantages for colonizing harsh and unstable environments.

Allopolyploidization involves the merger of two different, and often divergent, genomes whose reconciliation in a common nucleus often leads to myriad changes, including unequal expression of the two merging genomes. Biased expression among homeologues has been found in cotton and wheat (Pumphrey *et al.*, 2009; Rapp *et al.*, 2009). Previous studies have suggested bias toward the *B. rapa* A genome in the transcriptional expression of rRNA genes (Chen and Pikaard, 1997). In the present study it is shown that most of the *BnaGLN1* homeologous pairs display similar expression levels in the various tissues studied. Differences in mRNA contents observed between homeologous pairs of A and C genome origins were generally very small. No systematic bias towards the *B. oleracea* C parental genome or *B. rapa* A genome can be

identified in this study. Bias towards the *B. oleracea* C parental genome was identified for *BnaGSL* (at flowering and seed filling stages), *BnaGLN1.3.a* (especially at the vegetative stage), and *BnaGLN1.4.a* homeologues, and in favour of the *B. rapa* parental genome for *BnaGLN1.1.a* and *BnaGLN1.2.a*. These results are in agreement with the recent finding that nearly 7% of the potentially identified homeologous genes expressed in a leaf extract are displaying a differential expression level in favour of the A or C parental genome for 1/3 and 2/3 of the pairs, respectively, and that genes involved in metabolic processes tend to be over-represented (Higgins *et al.*, 2012).

Beside their intrinsic expression levels, it was found that the *BnaGLN1* genes are similarly regulated depending on their orthology group and that they are differentially regulated between groups. Overall it was found that specificities of expression are conserved between *BnaGLN1* genes and their respective *AtGLN1* orthologues, raising the hypothesis of conserved physiological functions.

In *Arabidopsis*, several studies have shown that *AtGLN1.1* is highly induced in leaves during senescence (Guo *et al.*, 2004) and is up-regulated when exogenous N sources are limiting (Lothier *et al.*, 2011). Up-regulation of *AtGLN1.1* under nitrate starvation is in good agreement with the kinetic properties described by Ishiyama *et al.* (2004) that suggested that the high affinity of *AtGLN1.1* for ammonium is correlated with a role for the enzyme under low N conditions. The induction of the expression of the two *BnaGLN1.1* genes in older stems and leaves is conserved, as already shown by Buchanan-Wollaston and Ainsworth (1997) and Ochs *et al.* (1999). It was also found that the two *BnaGLN1.1* genes are overexpressed under low nitrate conditions especially at the vegetative stage. As the amino acid residues known to be involved in the high affinity of *AtGLN1* towards ammonium are not conserved in any of the *BnaGLN1* proteins, no information about the potential kinetic properties can be extrapolated from the protein sequence. Regarding expression profiles, it is at least suspected that *BnaGLN1.1* and *AtGLN1.1* proteins might have similar roles.

In a previous study, it was found that *AtGLN1.2* is slightly induced by leaf ageing and that the expression profile is biphasic, with an increase from young to mature leaves and then a decrease in strongly senescing leaves (Diaz *et al.*, 2008; Lothier *et al.*, 2011). In addition, it was found that *AtGLN1.2* is mainly expressed in roots and leaves under a high N regime (Guo *et al.*, 2004; Ishiyama *et al.*, 2004; Lothier *et al.*, 2011). A detailed functional analysis led to the conclusion that *AtGLN1.2* was involved in primary ammonium assimilation under high N regimes (Ishiyama *et al.*, 2004; Lothier *et al.*, 2011). *BnaGLN1.2* genes (also named *BnGSR2.1* and *BnGSR2.2*) are also more highly expressed in roots than in shoots (Ochs *et al.*, 1999). It is shown here that the two *BnaGLN1.2* genes are more expressed in young leaves than in old leaves and are overexpressed under high N regimes, suggesting a similar role to *AtGLN1.2* in primary ammonium assimilation. Interestingly, a *BraA.GLN1.2* gene, named *BcGS1* (Sun *et al.*, 2010), was found also to be expressed in root and induced under high N regimes, suggesting the conservation of the regulation in the Brassiceae tribe.

Similarly to *AtGLN1.3*, the *BnaGLN1.3* genes are not induced in older leaves at the vegetative stage and do not respond to differential N regimes (Guo *et al.*, 2004; Lothier *et al.*, 2011). The hypothesis about the physiological roles of *AtGLN1.3* in N export via phloem tissues in roots is supported by the high capacity of the enzyme for glutamine synthesis and by the location of *AtGLN1.3* expression in the root vasculature (Ishiyama *et al.*, 2004). It has to be noted that *BnaGLN1.3* genes are the only *BnaGLN1* genes preferentially expressed in stem tissues compared with leaf blades. As stems are richer in vascular tissues than leaf blades, the higher expression of *BnaGLN1.3* in stems might be related to a potential vascular localization that remains to be explored.

AtGLN1.4 is one of the markers used for leaf senescence (Guo *et al.*, 2004; Wingler *et al.*, 2009). *AtGLN1.4* is induced by N limitation or starvation in both the root and shoot (Ishiyama *et al.*, 2004; Lothier *et al.*, 2011). *AtGLN1.4* protein exhibits high affinity towards ammonium and is expressed in the pericycle cells of roots (Ishiyama *et al.*, 2004). Evidence for *BnaGLN1.4a* root expression was found in EST libraries. However, induction of gene expression in leaves in response to ageing and low N regime is not well conserved among the four *BnaGLN1.4* orthologues in regards to developmental stages. The *BnaGLN1.4* genes are significantly overexpressed in senescing leaves and under low nitrate conditions at the vegetative stage. However, this trend is not conserved at the flowering and seed filling stages. *BnaA.GLN1.4.a*, *BnaC.GLN1.4.a*, and *BnaC.GLN1.4.b* are clearly and significantly less highly expressed in old than in young leaves at these stages. Furthermore, as the residues conferring the high affinity property are partially conserved in *BnaGLN1.4* proteins, it might be suspected that *BnaGLN1.4* genes have a role when N resources are low. Surprisingly, in contrast to *Arabidopsis* in which *AtGLN1.4* expression is one of the lowest, *BnaGLN1.4* expression levels are the highest found among all the *BnaGLN1* genes.

In *Arabidopsis*, *AtGLN1.5* expression is known as the lowest of the *AtGLN1* gene family. Expression was mainly found in seeds (Lothier *et al.*, 2011), and very little is known about *AtGLN1.5*. *BnaGLN1.5* gene expression is also very low, and it was not possible to measure it in leaf and stem tissues at flowering and vegetative stages. Similarly to *AtGLN1.5*, *BnaGLN1.5* ESTs were found in reproductive tissues and seeds, thus suggesting specific roles during seed maturation.

Conclusion

A total of 16 *B. napus* *GLN1* genes were identified, among which 12 have never been described. The total number of *BnaGLN1* genes, their phylogenetic relationships, and genetic location are in agreement with the evolutionary history of *Brassica* species. Some specificities of expression seemed to be conserved among the Brassiceae tribe and especially between *A. thaliana* and *B. napus*. Regulations arising from plants interactions with their environment (such as N resources), final architecture, and therefore sink–source relations *in planta*, seem to be globally conserved when compared with data available from the *Arabidopsis* model. Considering the

architectural, size, and lifespan differences between *A. thaliana* and *B. napus*, it is not surprising to find some differences in gene expression profiles. Also, due to the higher number of *GLN1* genes conserved in the *B. napus* genome, it seems correct to find some specificities in the expression of each *BnaGLN1* in contrast to genes involved in flavonoid biosynthesis that display highly conserved expression profiles between *A. thaliana* and *B. napus* during seed development and are highly dependent on tissue differentiation (Auger *et al.*, 2009). A more detailed localization of *BnaGLN1* gene expression would refine the hypothesis concerning their physiological role. Indeed, the present expression study relied on leaf blade and stem samples consisting of different tissues with contrasting physiological roles, in particular parenchyma and vascular tissues. Such a localization study could be advantageously performed in *Arabidopsis* and *B. napus* to provide a new basis for comparison of the evolution of this gene family.

Supplementary data

Supplementary data are available at *JXB* online

Figure S1. *BnaGLN1* gene localization on the A or C genome using a panel of various *Brassica* genotypes.

Figure S2. *BnaGLN1* gene localization on LGs using mono- and polysomic additional lines.

Figure S3. Positions of *BnaGLN1* genes on the *B. napus* genetic map.

Figure S4. Alignments of the genomic sequence, deduced mRNA sequence, and contig of EST sequences are reported for each *BnaGLN1* gene.

Figure S5. Expression of *BnaGLN1* genes is modified depending on nitrate availability and ageing in primary veins of vegetative *B. napus* plants.

Table S1. Clones from Genoplante and ADIS-MPIZ oilseed rape cDNA libraries used for *BnaGLN1* mRNA sequencing.

Table S2. Primers used for cloning and genetic mapping of the *BnaGLN1* gene.

Table S3. Specific primers used for sequencing *BnaGLN1* cDNAs.

Table S4. qPCR primers used for *BnaGLN1* gene expression analysis.

Table S5. Induction of *BnaGLN1* gene expression under low N fertilization in field-grown plants.

Data File S1. List and description of EST sequences belonging to each *B. napus*, *B. oleracea*, and *B. rapa* *GLN1* contig, and tables of the distribution of ESTs between libraries according to their *BnaGLN1* contigs.

Data File S2. *BnaGLN1* contig sequences in fasta format.

Data File S3. Global multiple alignment of nucleotide sequences in the study.

Data File S4. Genomic sequences of the *BnaGLN1* genes.

Data File S5. Deduced *BnaGLN1* mRNA sequences.

Acknowledgements

We thank A.M. Chevre and F. Eber (IGEPP, INRA Rennes) for providing unpublished monosomic and polysomic additional lines from *B. napus*; and

B. Weisshaar (Center for Biotechnology, University of Bielefeld, Germany) and Genoplante for providing cDNA clones. We thank members of the molecular biology laboratory (IGEPP, INRA Rennes) for access to facilities and providing genomic DNA from different *Brassica* species and genotypes, and the experimental group (IGEPP, INRA Rennes) and unit Domaine de la Motte au Vicomte (INRA Rennes) for help with growing *B. napus* plants. We are grateful to M.F. Niogret and C. Safray for help with tissues sampling (IGEPP, INRA Rennes). We thank Dr Michèle Reisdorf-Cren (INRA, UVSQ Versailles, France) and Fabienne Soulay (INRA, Versailles, France) for help. This work was supported by the Institut National de la Recherche Agronomique, Centre Technique des Oléagineux (CETIOM), Sofiprotéol (to JJ), and ANR Genoplante programmes ARCOLE [ANR-05-GPLA-032-05] and GENERGY [ANR-07-GPLA-016-001]. CETIOM provided a PhD grant to MM.

References

- Albert B, Le Caherec F, Niogret MF, Faes P, Avice JC, Leport L, Bouchereau A.** 2012. Nitrogen availability impacts oilseed rape (*Brassica napus* L.) plant water status and proline production efficiency under water-limited conditions. *Planta* **236**, 659–676.
- Altschul SF, Lipman DJ.** 1990. Protein database searches for multiple alignments. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **87**, 5509–5513.
- Auger B, Baron C, Lucas M, Vautrin S, Berges H, Chalhoub B, Fautrel A, Renard M, Nesi N.** 2009. Brassica orthologs from BANYULS belong to a small multigene family, which is involved in procyanidin accumulation in the seed. *Planta* **230**, 1167–1183.
- Bekaert M, Edger PP, Pires JC, Conant GC.** 2011. Two-phase resolution of polyploidy in the Arabidopsis metabolic network gives rise to relative and absolute dosage constraints. *The Plant Cell* **23**, 1719–1728.
- Bernard SM, Habash DZ.** 2009. The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytologist* **182**, 608–620.
- Brauc S, De Vooght E, Claeys M, Hofte M, Angenon G.** 2011. Influence of over-expression of cytosolic aspartate aminotransferase on amino acid metabolism and defence responses against Botrytis cinerea infection in Arabidopsis thaliana. *Journal of Plant Physiology* **168**, 1813–1819.
- Buchanan-Wollaston V, Ainsworth C.** 1997. Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridisation. *Plant Molecular Biology* **33**, 821–834.
- Chen ZJ, Pikaard CS.** 1997. Transcriptional analysis of nucleolar dominance in polyploid plants: biased expression/silencing of progenitor rRNA genes is developmentally regulated in *Brassica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **94**, 3442–3447.
- Cheng F, Liu S, Wu J, Fang L, Sun S, Liu B, Li P, Hua W, Wang X.** 2011. BRAD, the genetics and genomics database for Brassica plants. *BMC Plant Biology* **11**, 136.
- Colnenne C, Meynard JM, Reau R, Justes E, Merrien A.** 1998. Determination of a critical nitrogen dilution curve for winter oilseed rape. *Annals of Botany* **81**, 311–317.
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR.** 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiology* **139**, 5–17.
- De Smet R, Van de Peer Y.** 2012. Redundancy and rewiring of genetic networks following genome-wide duplication events. *Current Opinion in Plant Biology* **15**, 168–176.
- Delourme R, Falentin C, Huteau V, et al.** 2006. Genetic control of oil content in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **113**, 1331–1345.
- Diaz C, Lemaitre T, Christ A, Azzopardi M, Kato Y, Sato F, Morot-Gaudry JF, Le Dily F, Masclaux-Daubresse C.** 2008. Nitrogen recycling and remobilization are differentially controlled by leaf senescence and development stage in Arabidopsis under low nitrogen nutrition. *Plant Physiology* **147**, 1437–1449.
- Eisenberg D, Gill HS, Pfluegl GMU, Rotstein SH.** 2000. Structure–function relationships of glutamine synthetases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1477**, 122–145.
- Franzke A, Lysak MA, Al-Shehbaz IA, Koch MA, Mummenhoff K.** 2011. Cabbage family affairs: the evolutionary history of Brassicaceae. *Trends in Plant Science* **16**, 108–116.
- Guo Y, Cai Z, Gan S.** 2004. Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence. *Plant, Cell and Environment* **27**, 521–549.
- Herrera-Rodriguez MB, Maldonado JM, Perez-Vicente R.** 2006. Role of asparagine and asparagine synthetase genes in sunflower (*Helianthus annuus*) germination and natural senescence. *Journal of Plant Physiology* **163**, 1061–1070.
- Herrera-Rodriguez MB, Perez-Vicente R, Maldonado JM.** 2007. Expression of asparagine synthetase genes in sunflower (*Helianthus annuus*) under various environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* **45**, 33–38.
- Higgins J, Magusin A, Trick M, Fraser F, Bancroft I.** 2012. Use of mRNA-seq to discriminate contributions to the transcriptome from the constituent genomes of the polyploid crop species *Brassica napus*. *BMC Genomics* **13**, 247.
- Hirel B, Bertin P, Quillere I, et al.** 2001. Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. *Plant Physiology* **125**, 1258–1270.
- Hirel B, Le Gouis J, Ney B, Gallais A.** 2007. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *Journal of Experimental Botany* **58**, 2369–2387.
- Huang XQ, Madan A.** 1999. CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Research* **9**, 868–877.
- Inaba R, Nishio T.** 2002. Phylogenetic analysis of Brassicaceae based on the nucleotide sequences of the S-locus related gene, SLR1. *Theoretical and Applied Genetics* **105**, 1159–1165.
- Ishiyama K, Inoue E, Watanabe-Takahashi A, Obara M, Yamaya T, Takahashi H.** 2004. Kinetic properties and ammonium-dependent regulation of cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 16598–16605.
- Ishiyama K, Inoue E, Yamaya T, Takahashi H.** 2006. Gln49 and Ser174 residues play critical roles in determining the catalytic efficiencies of plant glutamine synthetase. *Plant and Cell Physiology* **47**, 299–303.
- Kosambi DD.** 1944. The estimation of map distance from recombination values. *Annals of Eugenics* **12**, 172–175.
- Laine P, Ourry A, Macduff J, Boucaud J, Salette J.** 1993. Kinetic parameters of nitrate uptake by different catch crop species—effects of low-temperatures or previous nitrate starvation. *Physiologia Plantarum* **88**, 85–92.
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newberg LA, Newburg L.** 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* **1**, 174–181.
- Lombard V, Delourme R.** 2001. A consensus linkage map for rapeseed (*Brassica napus* L.): construction and integration of three individual maps from DH populations. *Theoretical and Applied Genetics* **103**, 491–507.
- Lothier J, Gaufichon L, Sormani R, et al.** 2011. The cytosolic glutamine synthetase GLN1:2 plays a role in the control of plant growth and ammonium homeostasis in Arabidopsis rosettes when nitrate supply is not limiting. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1375–1390.
- Lysak MA, Koch MA, Pecinka A, Schubert I.** 2005. Chromosome triplication found across the tribe Brassicaceae. *Genome Research* **15**, 516–525.
- Makowski D, Maltas A, Morison M, Reau R.** 2005. Calculating N fertilizer doses for oil-seed rape using plant and soil data. *Agronomy for Sustainable Development* **25**, 159–161.
- Malagoli P, Laine P, Rossato L, Ourry A.** 2005. Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*) from stem extension to harvest—I. Global N flows between vegetative and reproductive tissues in relation to leaf fall and their residual N. *Annals of Botany* **95**, 853–861.
- Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson JB, et al.** 2011. CDD: a conserved domain database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Research* **39**, D225–D229.
- Martin A, Belastegui-Macadam X, Quillere I, Floriot M, Valadier MH, Pommel B, Andrieu B, Donnison I, Hirel B.** 2005. Nitrogen management and senescence in two maize hybrids differing in the persistence of leaf greenness: agronomic, physiological and molecular aspects. *New Phytologist* **167**, 483–492.

- Martin A, Lee J, Kichey T, et al.** 2006. Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production. *The Plant Cell* **18**, 3252–3274.
- Masclaux C, Quillere I, Gallais A, Hirel B.** 2001. The challenge of remobilisation in plant nitrogen economy. A survey of physio-agronomic and molecular approaches. *Annals of Applied Biology* **138**, 69–81.
- Masclaux C, Valadier MH, Brugiere N, Morot-Gaudry JF, Hirel B.** 2000. Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* **211**, 510–518.
- Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M, Orsel M.** 2008. Leaf nitrogen remobilisation for plant development and grain filling. *Plant Biology (Stuttgart)* **10** Suppl 1, 23–36.
- Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M, Pageau K, Lelandais M, Grandjean O, Kronenberger J, Valadier MH, Feraud M, Jouglet T, Suzuki A.** 2006. Glutamine synthetase–glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink–source nitrogen cycle in tobacco. *Plant Physiology* **140**, 444–456.
- Nagaharu U.** 1935. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilisation. *Japanese Journal of Botany* **7**, 389–452.
- Ochs G, Schock G, Trischler M, Kosemund K, Wild A.** 1999. Complexity and expression of the glutamine synthetase multigene family in the amphidiploid crop *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology* **39**, 395–405.
- Ostergaard L, King GJ.** 2008. Standardized gene nomenclature for the *Brassica* genus. *Plant Methods* **4**, 10.
- Parkin IAP, Gulden SM, Sharpe AG, Lukens L, Trick M, Osborn TC, Lydiate DJ.** 2005. Segmental structure of the *Brassica napus* genome based on comparative analysis with *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **171**, 765–781.
- Paterson AH, Lan T-h, Amasino R, Osborn TC, Quiros C.** 2001. *Brassica* genomics: a complement to, and early beneficiary of, the *Arabidopsis* sequence. *Genome Biology* **2**, REVIEWS1011.
- Pumphrey M, Bai J, Laudencia-Chingcuanco D, Anderson O, Gill BS.** 2009. Nonadditive expression of homoeologous genes is established upon polyploidization in hexaploid wheat. *Genetics* **181**, 1147–1157.
- Rana D, Boogaart T, O'Neill CM, Hynes L, Bent E, Macpherson L, Park JY, Lim YP, Bancroft I.** 2004. Conservation of the microstructure of genome segments in *Brassica napus* and its diploid relatives. *The Plant Journal* **40**, 725–733.
- Rapp RA, Udall JA, Wendel JF.** 2009. Genomic expression dominance in allopolyploids. *BMC Biology* **7**, 10.
- Rathke GW, Behrens T, Diepenbrock W.** 2006. Integrated nitrogen management strategies to improve seed yield, oil content and nitrogen efficiency of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.): a review. *Agriculture Ecosystems and Environment* **11**, 80–108.
- Ritz C, Spiess A-N.** 2008. qpcR: an R package for sigmoidal model selection in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis. *Bioinformatics* **24**, 1549–1551.
- Rossato L, Laine P, Ourry A.** 2001. Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: nitrogen fluxes within the plant and changes in soluble protein patterns. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1655–1663.
- Rutledge RG.** 2004. Sigmoidal curve-fitting redefines quantitative real-time PCR with the prospective of developing automated high-throughput applications. *Nucleic Acids Research* **32**, e178.
- Schjoerring JK, Bock JGH, Gammelvind L, Jensen CR, Mogensen VO.** 1995. Nitrogen incorporation and remobilization in different shoot components of field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) as affected by rate of nitrogen application and irrigation. *Plant and Soil* **177**, 255–264.
- Schranz ME, Lysak MA, Mitchell-Olds T.** 2006. The ABC's of comparative genomics in the Brassicaceae: building blocks of crucifer genomes. *Trends in Plant Science* **11**, 535–542.
- Seifi HS, Van Bockhaven J, Angenon G, Hofte M.** 2013. Glutamate metabolism in plant disease and defense: friend or foe? *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**, 475–485.
- Soltis D, Albert V, Leebens-Mack J, Bell C, Paterson A, Zheng C, Sankoff D, dePamphilis C, Wall P, Soltis P.** 2009. Polyploidy and angiosperm diversification. *American Journal of Botany* **96**, 336–348.
- Sun FF, Yang XD, Li Y, Hou XL.** 2010. Molecular cloning and characterisation of cytoplasmic glutamine synthetase gene BcGS1 from non-heading Chinese cabbage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **90**, 891–897.
- Swarbreck SM, Defoin-Platel M, Hindle M, Saqi M, Habash DZ.** 2011. New perspectives on glutamine synthetase in grasses. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1511–1522.
- Tabuchi M, Sugiyama K, Ishiyama K, Inoue E, Sato T, Takahashi H, Yamaya T.** 2005. Severe reduction in growth rate and grain filling of rice mutants lacking OsGS1;1, a cytosolic glutamine synthetase1;1. *The Plant Journal* **42**, 641–651.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ.** 1994. CLUSTAL-W—improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673–4680.
- Tilsner J, Kassner N, Struck C, Lohaus G.** 2005. Amino acid contents and transport in oilseed rape (*Brassica napus* L.) under different nitrogen conditions. *Planta* **221**, 328–338.
- Town CD, Cheung F, Maiti R, et al.** 2006. Comparative genomics of *Brassica oleracea* and *Arabidopsis thaliana* reveal gene loss, fragmentation, and dispersal after polyploidy. *The Plant Cell* **18**, 1348–1359.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F.** 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3**, RESEARCH0034.
- Wang J, Lydiate DJ, Parkin IAP, Falentin C, Delourme R, Carion PWC, King GJ.** 2011. Integration of linkage maps for the Amphidiploid *Brassica napus* and comparative mapping with *Arabidopsis* and *Brassica rapa*. *BMC Genomics* **12**, 101.
- Wang X, Wang H, Wang J, et al.** 2011. The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. *Nature Genetics* **43**, 1035–1039.
- Wingler A, Masclaux-Daubresse C, Fischer AM.** 2009. Sugars, senescence, and ageing in plants and heterotrophic organisms. *Journal of Experimental Botany* **60**, 1063–1066.

3) Conclusion et perspectives.

Cette étude a permis d'identifier, par deux méthodes distinctes (assemblage d'ESTs (M. Orsel) et recherche des gènes dans le génome (M. Moison)), les 16 gènes appartenant à la famille multigénique *GLN1* chez *Brassica napus*. Grâce à une analyse phylogénétique réalisée à partir des séquences codantes des différents gènes de *Brassica napus* et d'*Arabidopsis thaliana* et associant les contigs des *GLN1* des deux parents ancestraux du colza, *Brassica rapa* et *Brassica oleracea*, nous avons pu mettre en évidence des clusters d'homologues pour chacun des gènes d'*Arabidopsis* avec deux, quatre ou six gènes homologues chez le colza. A l'intérieur de chacun de ces clusters, des groupes d'homéologie ont été identifiés regroupant deux gènes de *B. napus* avec chacun de leur progéniteur respectif. Au sein de ces groupes, les gènes ont des structures exons/introns très similaires et leurs profils d'expression sont globalement similaires entre eux et à celui de leur homologue chez *Arabidopsis*. L'ensemble de ces résultats, suggérant une conservation de fonction chez les Brassicacées, est encourageant pour envisager un éventuel transfert de connaissances entre *Arabidopsis* et *Brassica napus* dans l'avenir. En effet, au vu de la complexité de la famille multigénique *GLN1* chez *B. napus*, il pourra être plus aisé et rapide d'utiliser une construction génétique préalablement testée sur *Arabidopsis* afin d'obtenir des lignées de colza transformées et d'évaluer l'amélioration potentielle de leur NUE. Cependant, il est tout d'abord nécessaire de connaître en détail les gènes *GLN1* chez *Arabidopsis* au niveau de leurs profils d'expression (voir Chapitre II) et de leur participation dans le processus de remobilisation de l'azote (voir Chapitre III).

56

En parallèle de l'analyse de l'expression des gènes *BnaGLN1* en fonction de la nutrition azotée et de la sénescence foliaire, l'analyse des protéines totales et du niveau de l'activité GS totale doit être effectuée. Les échantillons utilisés pour l'analyse de l'expression des gènes *BnaGLN1* sont disponibles et permettront de déterminer l'évolution de l'activité GS en fonction de ces deux paramètres et la participation des GS1 dans cette activité.

Sur ces mêmes échantillons, une analyse métabolomique est effectuée. Elle va permettre de mettre en évidence les modifications métaboliques influencées par le vieillissement foliaire et la disponibilité en azote chez *Brassica napus*. Ce métabolome de la feuille sénescence de colza permettra une comparaison avec celui d'*Arabidopsis* qui a été largement décrit dans la littérature (Watanabe et al., 2013) et sera une base de comparaison pour l'étude éventuelle de mutants ou transformants *GLN1*. Plus largement, il sera également possible de comparer ce métabolome avec celui d'autres espèces (maïs, *Arabidopsis*, orge) chez lesquelles les effets de la sénescence, du statut azoté et/ou de l'ontogénie ont été étudiés (Krapp et al., 2011; Amiour et al., 2012; Watanabe et al., 2013) (Avila-Ospina et al, soumis).

Afin de réaliser un travail similaire sur la famille multigénique des asparagine synthétases, les séquences génomiques de *Brassica napus* présentant des similarités avec les protéines ASN d'*Arabidopsis* ont été extraites du génome (contribution de Jérémy Just et Boulos Chalhoub) comme cela avait été le cas pour les séquences de GS de colza. En effet, comme nous l'avons vu précédemment en introduction, les trois gènes *ASN* présentent des profils d'expression distincts chez *Arabidopsis* suggérant des rôles différents de chacune des isoformes dans le métabolisme azoté. Il sera intéressant de déterminer le nombre de gènes *BnaASN* présents chez le colza et d'analyser leurs expressions à l'aide du matériel biologique utilisé dans Orsel, Moison et al (2014), matériel disponible au laboratoire. Toutefois, par manque de temps, l'analyse des séquences génomiques n'a, pour le moment, pas pu être menée jusqu'au bout, les données préliminaires obtenues ne seront donc pas exposées dans ce manuscrit. De plus, dans le cas d'une mise en évidence de séquences ayant de forts taux d'homologie entre elles, un important travail de dessin d'amorces spécifiques et de tests d'efficacité, sera nécessaire avant de pouvoir envisager l'analyse des profils d'expression. Un tel travail pourra cependant permettre de fournir à la communauté travaillant sur le métabolisme de l'azote chez le colza un nouvel outil utile en plus de l'identification des gènes *BnaGLN1* et de leur profil d'expression. La connaissance des gènes *ASN* chez le colza est intéressante car cela permettra potentiellement également un transfert de connaissances à partir des données acquises chez *Arabidopsis* (voir Chapitre IV).

II Étude de l'expression des gènes *GLN1* chez *Arabidopsis thaliana*

Cette partie a été écrite sous forme d'article en vue d'une soumission prochaine.

1) Introduction

In plants, glutamine synthetase (GS, EC 6.3.1.2) is considered as a key enzyme for nitrogen (N) assimilation by catalyzing the ATP-dependent formation of glutamine from the condensation between glutamate and ammonium coming from various sources (i.e. ammonium uptake from the fertilized soil, nitrate reduction, photorespiration or also catabolism during senescence). Two distinct GS isoenzymes are found in plants with different sub cellular locations suggesting different roles in N metabolism. GS2 is located into the chloroplasts and is believed to play a major role, in mature leaves, in N primary assimilation and reassimilation of photorespiratory ammonium acting in concert with glutamate synthase via the GS2/GOGAT cycle. The cytosolic GS1 would synthesize glutamine in roots and in old senescent leaves when the activity of the GS2/GOGAT cycle decrease due to chloroplast degradation (Masclaux et al., 2000).

The analysis of *Arabidopsis* phloem sap composition revealed that glutamate, aspartate and their respective amides, glutamine and asparagine, are the amino acids detected at the highest concentrations in saps (Hunt et al., 2010b). Therefore, these amino acids would be the major N compounds involved in the long distance transport of nitrogen *via* the phloem. Moreover, the ratio of GS1 and GS2 activities increases during senescence in parallel with the expression of some of the GS1 encoding genes. All together, these data suggest a role of GS1 in N remobilization.

In most plant species, GS2 is encoded by a unique gene whereas several GS1 isoenzymes are encoded by a multigene family (Cren and Hirel, 1999). Studies on the role of GS1 in N metabolism and remobilization are thus more complex. To date, functional analysis of GS1 isoforms using knock-out mutants are limited to few species. Three genes *OsGS1* have been identified in rice. *OsGS1;1* is expressed in all organs but at a higher level in leaf blade at vegetative stage (Tabuchi et al., 2005), *OsGS1;2* was detected in roots and found to respond to ammonium treatment (Ishiyama et al., 2004a), and *OsGS1;3* is specific of spikelet (Tabuchi et al., 2005). *OsGS1;1* and *OsGS1;2* displayed high-affinity for ammonium (Ishiyama et al., 2004a). The *OsGS1;1* mutation led to a reduction of biomass and grain filling probably due to a strong decrease in the glutamine dedicated for remobilization via the phloem (Tabuchi et al., 2005). A reduction of biomass and panicle number was found in *Osgs1;2* mutant, due to a severe reduction of ammonium primary assimilation in roots (Funayama et al., 2013). *OsGS1;3* is not well characterized yet but preliminary results showed delayed senescence in knock-out mutants (Yamaya and Kusano, 2014).

In maize, two *Gln1* genes expressed at several developmental stages and regardless of nutrition were studied. *Gln1-3* and *Gln1-4* are expressed in leaves and both *gln1-3* and *gln1-4* mutants show lower productivity, with reduced kernel number and size, respectively (Martin et al., 2006). In barley, no clear function was assigned to *GS1* genes, due to the absence of mutant analysis, but a detailed expression analysis of the three genes was performed by Goodall et al (2013) suggesting distinct roles for each isoform.

In addition to the reverse genetic approaches performed to study the role of each *GLN1* genes in various plant species, QTL (Quantitative Trait Loci) studies performed in maize and rice led to the co-localization of several QTL for agronomic traits (such as thousand kernel weight and kernel number) with QTL for GS activity (Hirel et al., 2001; Obara et al., 2004) and with *GS1* structural genes. Overexpression of the *GLN1* candidate genes then allowed researchers to confirm *GLN1* roles in traits of interest.

Beside these QTL studies, overexpression of cytosolic GS have already been performed in several plant species even before. They usually used constitutive promoters and led to various unexpected phenotypes. Despite some effects on shoot biomass and grain yields, results were difficult to reproduce and seemed to depend on growth conditions leading to the conclusion that no clear phenotype could be identified (for a review see (Thomsen et al., 2014)).

In Arabidopsis, five *GS1*-encoding genes (*GLN1;1-1;5*) were identified. Transcriptomic analysis of leaf senescence showed that *GLN1;1*, *GLN1;2* and *GLN1;4* are induced during leaf ageing (Guo et al., 2004). Ishiyama et al (2004b) studied the expression of *GLN1* genes in Arabidopsis roots. They showed that *GLN1;1* is the gene which respond the most to N deprivation whereas *GLN1;2* is induced by ammonium treatment. Using Promoter:GFP fusions, they showed that *GLN1;1* is expressed at the surface of the root (root tip, root hair and epidermis), *GLN1;2* and *GLN1;3* in root vasculature and *GLN1;4* in pericycle cells around the emergence site of lateral roots. Over-expression of each *GLN1* isoform and purification in *Escherichia coli* allowed the determination of their affinity for ammonium and glutamate. Authors showed that *GLN1;1* and *GLN1;4* are high affinity isoforms whereas *GLN1;2* and *GLN1;3* have low affinity for ammonium. They subsequently identified two amino acids residues (Gln49 and Ser174) responsible and sufficient for high affinity properties of *GLN1* isoforms in both Arabidopsis and rice (Ishiyama et al., 2006). The physiological characterization of *GLN1;2* gene performed by Lothier et al (2011) was consistent with this showing that this gene play a role in N assimilation and ammonium homeostasis at vegetative stage, and under high nitrate condition only.

Similarly to genes in rice or maize and because Arabidopsis *GLN1* genes seem to have distinct patterns of expression, it is believed that they can have specific and non-redundant roles in N

Table II-S1: List of primers used in this study

Name	Gene	Sequence (5' → 3')	Use
APT Q2+	APT (At1g27450)	CGGGGATTTTAAGTGGAAACA	qPCR (Housekeeping gene), forward primer
APT Q2-	APT (At1g27450)	GAGACATTTTGC GTGGGATT	qPCR (Housekeeping gene), reverse primer
qGLN1;1-F	GLN1;1 (At5g37600)	CAACCTTAACCTCTCAGACTCCACT	qPCR, forward primer
qGLN1;1-R	GLN1;1 (At5g37600)	CAGCTGCAACATCAGGGTTGCTA	qPCR, reverse primer
qGLN1;2-F	GLN1;2 (At1g66200)	TAACCTTGACATCTCAGACAACAGT	qPCR, forward primer
qGLN1;2-R	GLN1;2 (At1g66200)	TCAGCAATAACATCAGGGTTAGCA	qPCR, reverse primer
qGLN1;3-F	GLN1;3 (At3g17820)	TAACCTCAACCTCACC GATGCCACC	qPCR, forward primer
qGLN1;3-R	GLN1;3 (At3g17820)	CTTGGCAACGTCGGGGTGGCTG	qPCR, reverse primer
qGLN1;4-F	GLN1;4 (At5g16570)	CAATCTCGATCTCTCCGATTCCACT	qPCR, forward primer
qGLN1;4-R	GLN1;4 (At5g16570)	GGCGACAACACTAGGGTCTTCA	qPCR, reverse primer
qGLN1;5-F	GLN1;5 (At1g48470)	CCTAAACCTTGATCTATCAGACACC	qPCR, forward primer
qGLN1;5-R	GLN1;5 (At1g48470)	GCCTTCACATTGGGATGATCG	qPCR, reverse primer
qGLN2-F	GLN2 (At5g35630)	CCAACATGTGATGAGAGTGCC	qPCR, forward primer
qGLN2-R	GLN2 (At5g35630)	CCAGGTGCTTGACCGGTACTCG	qPCR, reverse primer
Prom11S	GLN1;1 (At5g37600)	AAAAAGCAGGCTATGGTTGTAGTCATTTGATTGG	amplification of GLN1;1 promoter, forward primer
Prom11AS	GLN1;1 (At5g37600)	AGAAAGCTGGGTTACAATACCAAGGGTTTGGATG	amplification of GLN1;1 promoter, reverse primer
Prom12S	GLN1;2 (At1g66200)	AAAAAGCAGGCTATTTTAGCAAGAGACCATCCACA	amplification of GLN1;2 promoter, forward primer
Prom12AS	GLN1;2 (At1g66200)	AGAAAGCTGGGTGGTTGCAAGAAGAAACAAGAAGA	amplification of GLN1;2 promoter, reverse primer
PGS31S	GLN1;3 (At3g17820)	AAAAAAGCAGGCTCCTGAGCCATGCGTTGAAGGG	amplification of GLN1;3 promoter, forward primer
PGS313	GLN1;3 (At3g17820)	AAGAAAGCTGGGTCGGCGGCGTCGGAGAG	amplification of GLN1;3 promoter, reverse primer
PGS41S	GLN1;4 (At5g16570)	AAAAAAGCAGGCTCTGCTTGTGGGGACAGACC	amplification of GLN1;4 promoter, forward primer
PGS413	GLN1;4 (At5g16570)	AAGAAAGCTGGGTCCTCAAGAATAATAAACC	amplification of GLN1;4 promoter, reverse primer
PGS51S	GLN1;5 (At1g48470)	AAAAAAGCAGGCTGAAACCCTCCTTTGG	amplification of GLN1;5 promoter, forward primer
PGS513	GLN1;5 (At1g48470)	AAGAAAGCTGGGTCGGTCTATTGATCTCAGTC	amplification of GLN1;5 promoter, reverse primer
HIS1.1-F	GLN1;1 (At5g37600)	CAATCCTCTGGAATCCTTGA	in situ hybridization, antisense probe
HIS1.1-RT7	GLN1;1 (At5g37600)	TGTAATACGACTCACTATAGGGCAAAAGCAGAATAAGCAGAGCAAA	in situ hybridization, antisense probe
HIS1.2-F	GLN1;2 (At1g66200)	CACTCCTCTGGAACCTTGA	in situ hybridization, antisense probe
HIS1.2-RT7	GLN1;2 (At1g66200)	TGTAATACGACTCACTATAGGGCAAAAGAAAGAGGCCCAAA	in situ hybridization, antisense probe
HIS1.3-F	GLN1;3 (At3g17820)	CGACCATACTCGGTTGATGA	in situ hybridization, antisense probe
HIS1.3-RT7	GLN1;3 (At3g17820)	TGTAATACGACTCACTATAGGGCTGTCAACAATACGCCATA	in situ hybridization, antisense probe
HIS1.4-F	GLN1;4 (At5g16570)	TCCACAATCCTTTGGAAACC	in situ hybridization, antisense probe
HIS1.4-RT7	GLN1;4 (At5g16570)	TGTAATACGACTCACTATAGGGCTCGTTCTCAGAAACAAATTGAAGA	in situ hybridization, antisense probe
HIS1.5-F	GLN1;5 (At1g48470)	TGCTGAAACCACCATCCTCT	in situ hybridization, antisense probe
HIS1.5-RT7	GLN1;5 (At1g48470)	TGTAATACGACTCACTATAGGGCTGAAAGAAAAGTCTAAATGCGAAA	in situ hybridization, antisense probe

assimilation and remobilization (Ishiyama et al., 2004a; Martin et al., 2006; Lothier et al., 2011). However, before studying their role in these two processes, a more complete and detailed study of their expression patterns is needed. The aim of this study is to provide a detailed picture of the expression pattern of each *GLN1* genes. Localization at plant, organ and sub-cellular levels was studied together with the expressions at different leaf ages and under low or high nitrate conditions. This allows us to present a picture of *GLN1* gene patterns of expression in Arabidopsis.

2) Materials and methods

Plant material

Wild-type Arabidopsis plants (Col-0 accession: CS60000, Salk) were used in this study in order to perform expression analysis of *GLN1* genes using qPCR and *in situ* hybridization. The expression of *GLN1* genes was also studied using transgenic plants carrying transcriptional fusions between the promoter of the *GLN1* genes and *uidA* reporter gene (*ProGLN1;x:uidA* constructs, see below). These plants were obtained by floral dipping (Clough and Bent, 1998).

Growth conditions

In soil: Seeds of wild-type Col-0 Arabidopsis plants (Salk accession: CS60000) were stratified, sown and cultivated at two nitrate supplies (2mM and 10mM) under short days. Rosettes were harvested at 20 and 60 DAS, and flowers at 105 DAS whereas stem parts were harvested after transfer to long days at 63 DAS. All harvests were performed between 13h and 14h and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further experiments or fixed for *in situ* hybridization (see below).

In vitro: Seeds were surface-sterilized by immersion in Bayrochlore/ethanol solution (5/95, v/v) and stratified in dark during 48h at 4°C before experiments. On day 0, seeds were distributed onto plates containing nitrate (5 mM KNO₃, 2.5 mM KH₂PO₄, 2 mM MgSO₄, 2 mM Ca(NO₃)₂, NaFe-EDTA 1%, 70 µM H₃BO₃, 14 µM MnCl₂, 0.5 µM CuSO₄, 0.2 µM Na₂MoO₄, 10 µM NaCl, 1 µM ZnSO₄, 0.01 µM CaCl₂, 1% sucrose, 0.7% agar pH 6.0). Plates were placed quasi-vertically in growth chamber at 22°C under 16 h light (70 µmol m⁻² s⁻¹)/8 h dark cycles. After 7 days, plantlets were individually transferred to square plates containing either (i) nitrate medium (Ctrl, see above), (ii) ammonium medium (NH₄⁺; similar to nitrate medium except that KNO₃ and Ca(NO₃)₂ was replaced by 5 mM NH₄Cl, 2mM CaCl₂ and 5 mM KCl), (iii) no-nitrogen medium (-N; similar to nitrate medium except that KNO₃ and Ca(NO₃)₂ was replaced by 2mM CaCl₂ and 5 mM KCl), or (iv) nitrate medium/no sucrose (-Sucr.). After

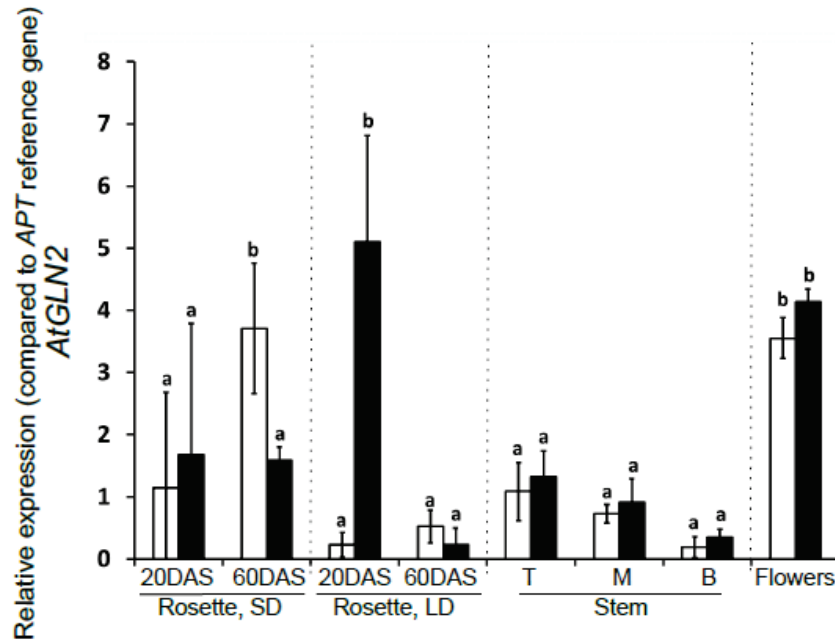


Figure II-S1. *AtGLN2* coding the chloroplastic GS isoenzyme is differentially expressed depending on organs, nitrate conditions and ageing. Relative expression levels were analyzed on cDNA from rosettes grown under short days (SD) or long days (LD) conditions, stems (bottom (B), middle (M) and top (T) parts) and flowers. Steady-state level of mRNA was measured using QRT-PCR and is presented as relative units normalized to *APT* reference gene expression. Relative expression of *AtGLN2* is presented for plants grown under low (white bars) or high nitrate (black bars) conditions. Means and standard deviation are for at least three biological repetitions. The different letters indicate values significantly different at $P < 0.05$ as determined using XLSTAT ANOVA Newman–Keuls (SNK) comparisons.

plant transfer, plates were placed quasi-vertically in the same growth chamber. After 14 days following transfer, shoots and roots of wild-type plants were harvested and stored at -80°C for further experiments.

RNA isolation, reverse transcription and qPCR analysis

Total RNA were isolated using the TRIzol® reagent (Life technologies, Saint-Aubin, France) according to manufacturer's guidelines and then used for reverse transcription by the M-MuLV reverse transcriptase (ThermoFischer Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) and oligo(dT) (Eurofins MWG operon, Ebersberg, Germany). Contaminating DNA was removed by DNaseI treatment (ThermoFischer Scientific, Villebon-sur-Yvette, France). Real-time PCR was performed on CFX thermocycler (Biorad, Marnes-La-Coquette, France) using Mesa FAST qPCR mastermix Plus for SYBR assay (Eurogentec, Angers, France). Expression levels were normalized with respect to *APT* (At1g27450) genes expression levels (whom stability over the tested samples was analyzed using the GeNorm software) and were averaged over at least three independent biological samples. Gene-specific amplification of primer couples (see Supplemental Table 1 for the list of used primers) was assessed by analysis of melting curve (the sequencing of the unique PCR product was performed according to Lothier et al, 2011).

GUS-based constructs and GUS staining

Amplification of approximately 2000bp of the GLN1 promoters was performed using Phusion high fidelity DNA polymerase (ThermoFischer Scientific, Villebon-sur-Yvette, France). The primers used are listed in Supplemental Table 1. PCR products were cloned in the pGWB3 vector using Gateway technology (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) following manufacturer's guidelines. Plants carrying *ProGLN1;x:uidA* constructs were stained for 24h in 50mM KH₂PO₄ pH7, 0.05% (v/v) Triton X-100, 5mM ferricyanide, 5mM ferrocyanide and 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronic acid (X-GlcA) at 1 mg.mL⁻¹. Plants were then destained in ethanol. Entire plants were observed under magnifying glass and leaf sections (8μm thick) under light microscope (DMRB, Leica microsystems) after cutting using Zeiss microtome.

In situ hybridization

Plants were fixed in 4% formaldehyde (fresh from paraformaldehyde) in PBS under vacuum for 3×20 minutes, and left in fixative overnight. After fixation, plants were washed, dehydrated, and embedded in paraffin, essentially as described by Jackson (1991). Paraffin sections (8μm thick) were cut with a disposable metal knife and attached to precoated glass slides (Fischer Scientific, US). Sense and antisense probes of *GLN1* genes were synthesized using the Riboprobe® combination system

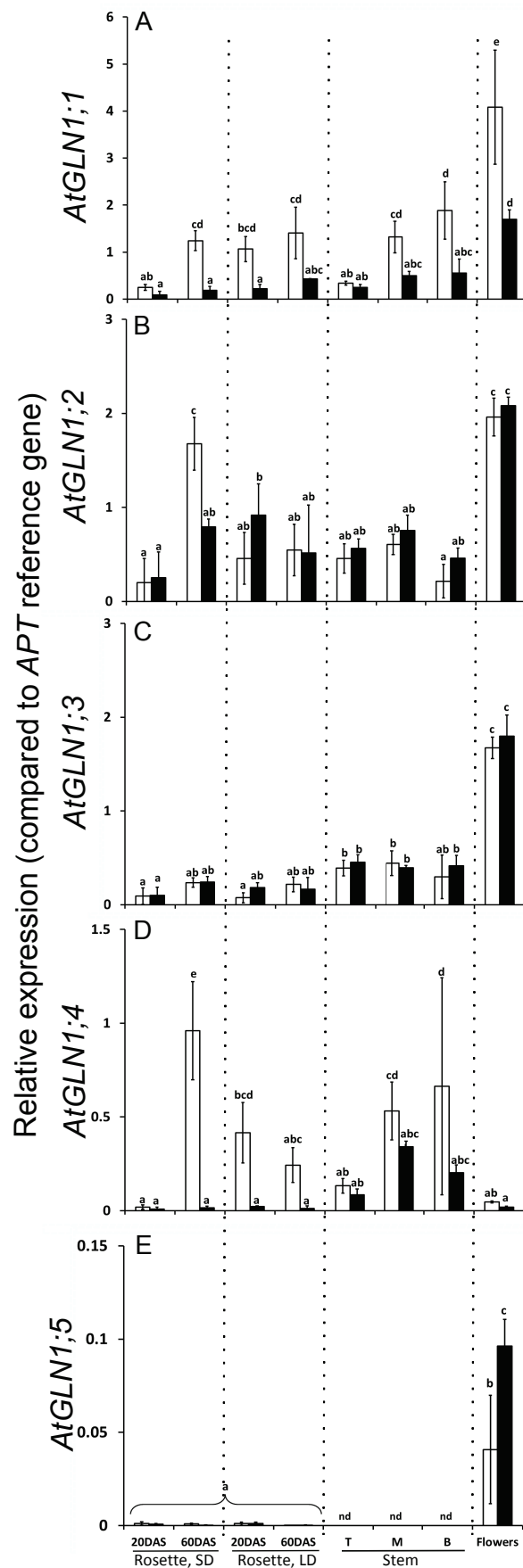


Figure II-1. The five *GLN1;x* genes of Arabidopsis are differentially expressed depending on organs, nitrate conditions and ageing. Relative expression levels were analyzed on cDNA from rosettes grown under short days (SD) or long days (LD) conditions, stems (top (T), middle (M) and bottom (B) parts) and flowers. Note that ageing of tissues is increasing from the left to the right for rosettes and stems. Steady-state level of mRNA was measured using QRT-PCR and is presented as relative units normalized to *APT* reference gene expression. Relative expressions of *AtGLN1;1* (A), *AtGLN1;2* (B), *AtGLN1;3* (C), *AtGLN1;4* (D), *AtGLN1;5* (E) are presented for plants grown under low (white bars) or high nitrate (black bars) conditions. Note that scales are different for each gene. nd: not detected. Means and standard deviation are for at least three biological repetitions. The different letters indicate values significantly different at $P < 0.05$ as determined using XLSTAT ANOVA Newman-Keuls (SNK) comparisons.

T3/T7 (Promega, Charbonnières, France) and digoxigenin (DIG-UTP; Roche Diagnostics, Meylan, France) on PCR products (see Supplemental Table 1) according to the manufacturer's instructions. In situ hybridization was carried out as described by Nikovics et al (2006) and the hybridization temperature was 43°C. Immunodetection of the DIG-labelled probes was performed using an anti-DIG antibody with alkaline phosphatase as described by the manufacturer (Roche Diagnostics, Meylan, France). The coloration reaction was done using BCIP/NBT Color development substrate (Promega, Charbonnières, France).

Immunolocalization of GS isoenzymes

Immunolocalization was performed on cauline leaf sections according to Lothier et al (2011). The polyclonal GS-targeted antibody was obtained from rabbits and revealed by a goat anti-rabbit secondary antibody coupled with Alexa 488 fluorochrome. Fluorescence was observed using a confocal microscope (Leica TCS SP2 AOBS).

3) Results

GLN1 genes are differentially expressed in rosettes, stems and flowers depending on nitrate conditions

In order to study the specific expression of each *GLN1* gene, quantitative RT-PCR analysis was conducted on different organs (whole rosette, stem, flowers) according to age tissue and nitrate growth conditions. Expression of *AtGLN2* gene (encoding the chloroplastic isoenzyme) was determined as control (Supplemental Figure II-S1) and showed as expected higher transcript levels in young tissues than in old ones. *AtGLN1;1* was highly expressed in shoot compared to others like *AtGLN1;3*, *AtGLN1;4* and *AtGLN1;5*. *AtGLN1;1* expression level was higher under low nitrate conditions and was induced by ageing in rosette (especially in short days and low nitrate conditions) and in stem (Fig. II-1A). *AtGLN1;2* was also induced by ageing in rosettes but specifically in short days conditions (Fig. II-1B). *AtGLN1;3* is slightly more expressed in the stem than in leaves and much more in flowers (Fig. II-1C). *AtGLN1;3* shows no differences in expression level regarding to nitrogen nutrition unlike *AtGLN1;4* which is clearly overexpressed under low nitrogen (Fig. II-1D). *AtGLN1;4* is also sharply induced by ageing under short days and also in old stem section (base) compared to young stem section (Top). Finally, *AtGLN1;5* is predominantly expressed in flowers especially under high nitrate conditions (Fig. II-1E). All *GLN1* genes, except *AtGLN1;4*, are expressed in flowers but only *AtGLN1;5* expression is flower-specific (no expression detected in stem and barely detectable in rosette). It is interesting to note that the various genes have distinct expression levels. *AtGLN1;1* and *AtGLN1;2* relative expression average compared to the APT reference gene is about 1.5 units,

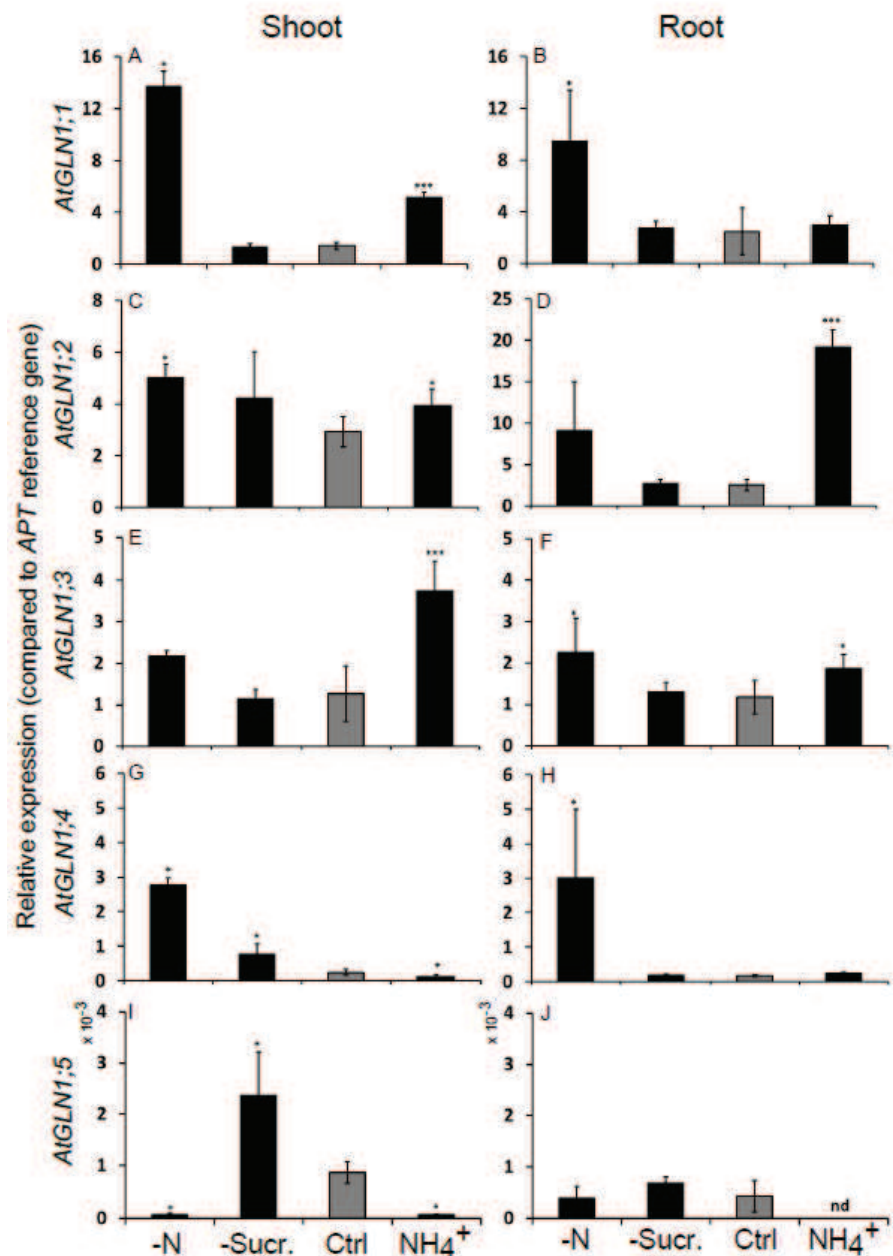


Figure II-2. The five *GLN1;x* genes of Arabidopsis are differentially expressed depending on nitrogen and carbon sources. Expression of the *GLN1;x* genes was monitored in shoot (left panel; A, C, E, G, I) and roots (right panel; B, D, F, H, J) of 21 days old Arabidopsis plantlets grown under control condition (Ctrl; 9mM nitrate and 1% (w/v) sucrose), sucrose deprivation (-Sucr.; 9mM nitrate and no sucrose), nitrate deprivation (-N; no nitrogen and 1% (w/v) sucrose) and ammonium medium (NH_4^+ ; 5mM NH_4^+ and 1% (w/v) sucrose). Control is shown by grey bars while treatments are shown by black bars. Steady-state level of mRNA was measured using QRT-PCR and is presented as relative units normalized to APT reference gene expression. Relative expressions of *AtGLN1;1* (A;B), *AtGLN1;2* (C;D), *AtGLN1;3* (E;F), *AtGLN1;4* (G;H) and *AtGLN1;5* (I;J) are presented. Treatments are represented by black bars and control condition by grey bars. For each gene, scales are the same between shoot and root, except for *AtGLN1;2* for which root scale is higher than shoot one. nd: not detected. Means and standard deviation are for three biological repetitions of 10 plants each. Significant differences were estimated using Student *t* test and are indicated by **P* < 0.05, ***P* < 0.01 and ****P* < 0.005.

AtGLN1;3 and *AtGLN1;4* genes about 0.5 units while *AtGLN1;5* is the most weakly expressed (relative expression of approximately 0.008 in the flowers).

Expression levels of GLN1 genes in shoot and root under challenging conditions

The effect of nitrogen sources and sucrose availability in the culture medium on *GLN1* gene expression was also monitored using qRT-PCR. These experiments were carried out on mRNA extracted from 21 days old seedlings grown *in vitro* under the following conditions: +N, 1% sucrose (control condition); +N, 0% sucrose (-Sucr.); -N, 1% sucrose (-N); NH_4^+ , 1% sucrose (NH_4^+). Shoot and root samples were collected separately and were separated for analysis. Compared to control conditions (Ctrl), *AtGLN1;1* is induced in both roots and shoot when the culture medium is depleted of nitrate (Fig. II-2A and II-2B), and in shoot when ammonium is provided as the sole nitrogen source (Fig. II-2B). *AtGLN1;2* is also induced in roots by nitrate deficiency and under ammonium conditions in both shoot and roots consistently with Lothier et al (2011) (Fig. II-2C-D). *AtGLN1;3* is induced by nitrogen deficiency in roots only (Fig. II-2E-F) and in both root and shoot by ammonium (Fig. II-2E-F). *AtGLN1;4* is clearly induced in shoot and roots by nitrogen deficiency (Fig. II-2G-H) and in shoot by sucrose deficiency (Fig. II-2G). In shoot, *AtGLN1;4* is repressed by ammonium (Fig. II-2G). Finally, in shoots, *AtGLN1;5* is induced when sucrose is absent and is repressed by nitrogen deficiency. In both shoot and roots, *AtGLN1;5* is repressed by ammonium (Fig. II-2I-J), expression dropping under the detection level in roots (Fig. II-2J).

Immunolocalization of both GS1 and GS2 in leaves revealed both chloroplast and cytosolic labeling in mesophyll cells

Immunolocalization was performed on cauline leaves grown under low and high nitrate conditions in order to observe the tissue and cellular localization of glutamine synthetase proteins in leaves (Fig. II-3). The polyclonal antibody raised against both GS1 and GS2 isoenzymes (see (Lemaitre et al., 2008)) has already been used by Lothier et al. (2011) for immunolocalization. A clear labeling of chloroplast stroma can be observed whatever the conditions of nutrition reflecting the presence of the chloroplastic isoenzyme (GS2). Although this strong chloroplastic labeling can impede the observation of a cytosolic one, clear cytosolic signal, surrounding cell vacuole and limited to small cytosol area between vacuole and cell wall, can be detected, under high magnification in parenchyma cells. This labeling corresponds to cytosolic GS (GS1) (Fig. II-3E and F). A cytosolic signal can also be observed in phloem companion cells (Fig. II-3D). It was surprising that a strong cytosolic signal was observed in the cambium cells under high nitrate (Fig. II-3C and D) whereas this signal could not be observed under low nitrate (not show).

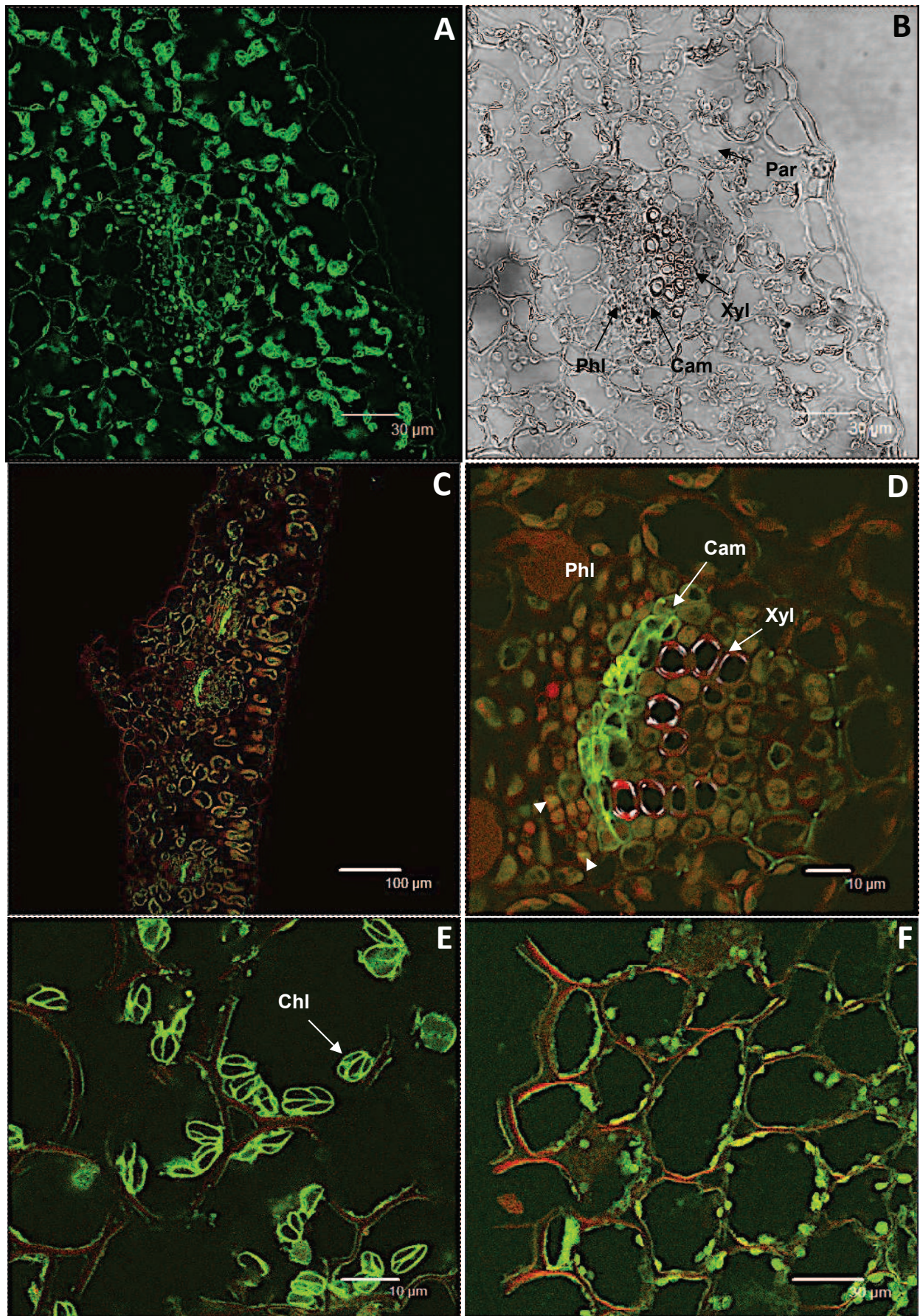


Figure II-3. GS immunolocalization in cauline leaves grown at low (A, B, E) or high nitrate (C, D, F). Cam: cambium. Chl: chloroplast. Par: parenchyma. Phl: phloem. Xyl: xylem. Arrowheads indicate labeled phloem companion cells (D).

PromGLN1:uidA fusion activities show different patterns of expression depending on each GLN1 promoters

To refine the analysis of the expression of the *GLN1* genes, promoter fusions with the *uidA* reporter gene were constructed and three independent transformants for each construct were analyzed by GUS activity *in vivo* staining. PromGLN1;1:*uidA* (Fig. II-4A and 4B) and PromGLN1;2:*uidA* (Fig. II-4C and 4D) fusions appeared more expressed in older leaves than in younger ones and also more expressed at the tip of leaves, which are known as more senescing regions, relative to the base of the leaves. PromGLN1;1:*uidA* was mainly detected in veins (Fig. II-4A and 4B) whereas PromGLN1;2:*uidA* was mainly detected in mesophyll (Fig. II-4C and 4D). PromGLN1;1:*uidA* and PromGLN1;2:*uidA* are not expressed in the primary vein and the petiole by contrast with PromGLN1;3:*uidA* (Fig. II-4E and 4F) and PromGLN1;5:*uidA* (Fig. II-4I and 4J). PromGLN1;3:*uidA* fusion is also expressed in hydathodes (Fig. II-4E and 4F). PromGLN1;4:*uidA* could not be detected whatever nitrate conditions in all the transformed lines selected with antibiotics (Fig. II-4G and 4H).

Expression in roots, observed in plants grown on sand during 50 days, only revealed GUS staining for PromGLN1;1:*uidA* (Fig. II-4K). In the PromGLN1;1:*uidA* lines, staining was more intense under low nitrate than under high (Fig. II-4K compared to 4L).

As a summary, we observed that all the PromGLN1;*x:uidA* are mainly expressed in leaf vasculature, except PromGLN1;2:*uidA* which is also expressed in the mesophyll. In order to show the specific patterns of expression of each PromGLN1;*x:uidA*, a selection of representative GUS stained rosette leaves of 40 DAS plants is shown in Figure 5. PromGLN1;1:*uidA* is mostly detected in secondary and tertiary veins (Fig. II-5A). Albeit PromGLN1;2:*uidA* is expressed in the mesophyll of leaf blades, it is also specifically observed in the minor veins, especially in younger leaf tissues (insert in Fig. II-5B and Lothier et al. 2011). PromGLN1;3:*uidA* is mainly expressed in the primary vein and also in the secondary veins (Fig. II-5C). PromGLN1;5:*uidA* is restricted to the primary vein (Fig. II-5D). In all the transformants selected for PromGLN1;4:*uidA*, it was not possible to detect GUS staining in leaves of 20 DAS, 40 DAS and any other older plants (Fig. II-5E). However, PromGLN1;4:*uidA* expression can be observed when plants were grown under salt stress (48 hours NaCl) that revealed GUS staining in the primary vein (Fig. II-5F).

Flower staining also revealed specific patterns (Figure II-6). PromGLN1;1:*uidA* was detected in the veins of petals under both low and high nitrate (Fig. II-6A and B, inserts) but at a weaker level under low nitrate (Fig. II-6A, insert). PromGLN1;2:*uidA* was detected in the stigmata (Fig. II-6C and 6D) with a clear blue signal in ovules under low nitrate (Fig. II-6C, insert). PromGLN1;3:*uidA* was sharply expressed at the top of the stem under low nitrate but not in flowers (Fig. II-6E) whereas,

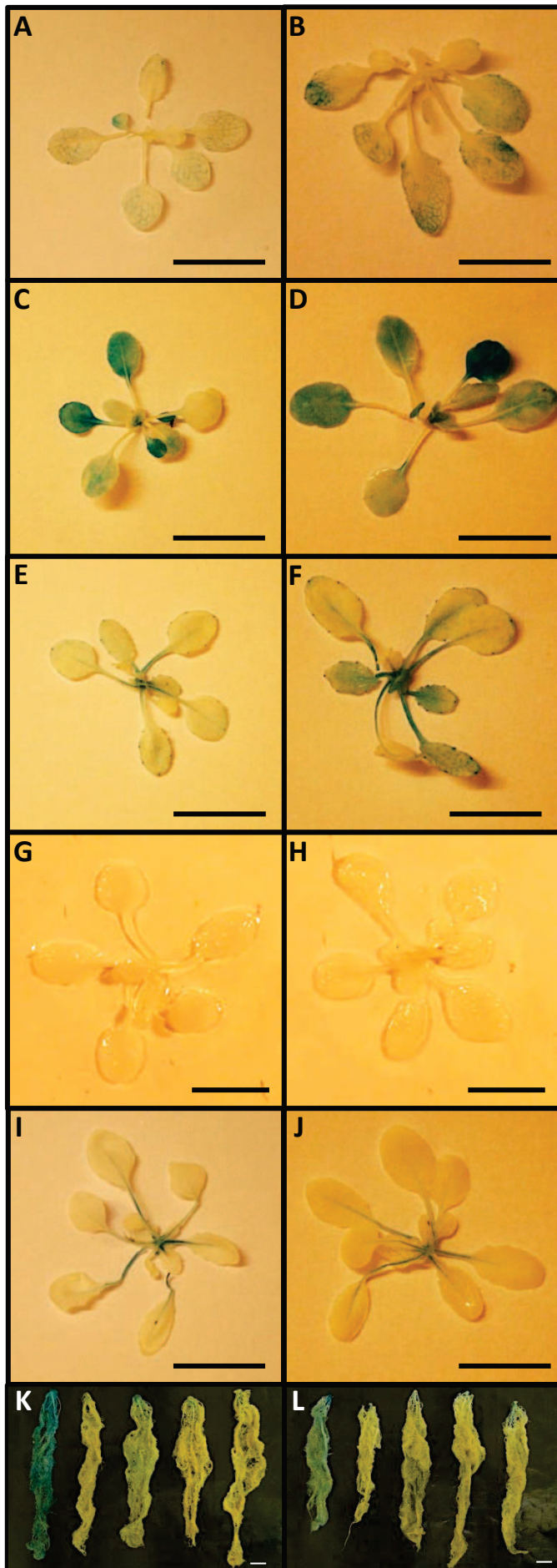


Figure II-4.

Expression of *ProGLN1*;x:*uidA* transcriptional fusions in plants. GUS staining of rosettes of plants grown under low (left panel: A, C, E, G, I) or high nitrogen (right panel: B, D, F, H, J) conditions for 20 days old plants are presented: *ProGLN1*;1:*uidA* (A, B); *ProGLN1*;2:*uidA* (C, D); *ProGLN1*;3:*uidA* (E, F); *ProGLN1*;4:*uidA* (G, H) and *ProGLN1*;5:*uidA* (I, J). Roots (K, L) of plants grown under low nitrogen (K) or high nitrogen (L) conditions for 49 days old plants are shown. Scale bars: 1 cm.

under high nitrate, the GUS staining was weaker in the stem but can also be detected in stigmata (Fig. II-6F, insert). PromGLN1;4:uidA was detected in anthers under both nitrate nutritions but at a higher level under high (Fig. II-6H) than low nitrate (Fig. II-6G). PromGLN1;5:uidA was surprisingly detected in flowers only under high nitrate conditions and the weak staining appeared quite diffuse (Fig. II-6J).

In situ localization of GLN1 mRNA and PromGLN1;x:uidA expression gave consistent results

The localization of *GLN1* gene expression in vascular tissues was first performed using light microscopy observation of the GUS staining performed on the PromGLN1;x:uidA transformants (Figure 5). For this, leaves were transversely sectioned. In parallel, *in situ* hybridizations were performed on equivalent leaves previously embedded, using mRNA-raised antisens probes. Using both labeling, *AtGLN1;1* expression was mainly detected in companion cells of minor veins (Fig. II-7A and 7B). *AtGLN1;2* was highly expressed in the mesophyll and the diffuse blue coloration due to PromGLN1;2:uidA expression (Fig. II-7E) was consistent with the high *in situ* hybridization signal that can be detected in the whole mesophyll (Fig. II-7G). Both GUS staining and *in situ* hybridization allowed us to detect also signal in the phloem companion cells, which was consistent with the presence of GLN1;2 protein in the companion cells of stems as previously found by Lothier et al. (2011) (Fig. II-6F and insert in Fig. II-6G). According to Figure 5, *AtGLN1;3* expression was detected in the primary and secondary veins. Fig. II-7C shows the GUS staining in companion cells of secondary veins and Fig. II-7D shows *AtGLN1;3* *in situ* hybridization in companion cells of primary vein. *AtGLN1;4* was also detected in the companion cells, especially in minor veins, using both methods (Fig. II-7H and 7I). *AtGLN1;5* was mostly detected in companion cells also and in both primary (Fig. II-7J and 7L) and secondary (Fig. II-7K) veins using GUS staining (Fig. II-7J and K) and *in situ* hybridization (Fig. II-7L).

4) Discussion

Glutamine synthetase is a key enzyme involved in N metabolism as it can participate to both ammonium assimilation and reassimilation for remobilization. However, studies on this enzyme are complex because two distinct isoenzymes exist, one in the chloroplasts (GS2) and another one in the cytosol (GS1), the later with several isoforms encoded by multigenic families (Cren and Hirel, 1999). GS immunolocalization shown in Figure 3 reveals both chloroplastic and cytosolic isoenzyme localizations in leaves. To date, most of the functional studies assigning specific roles to some GS1 in

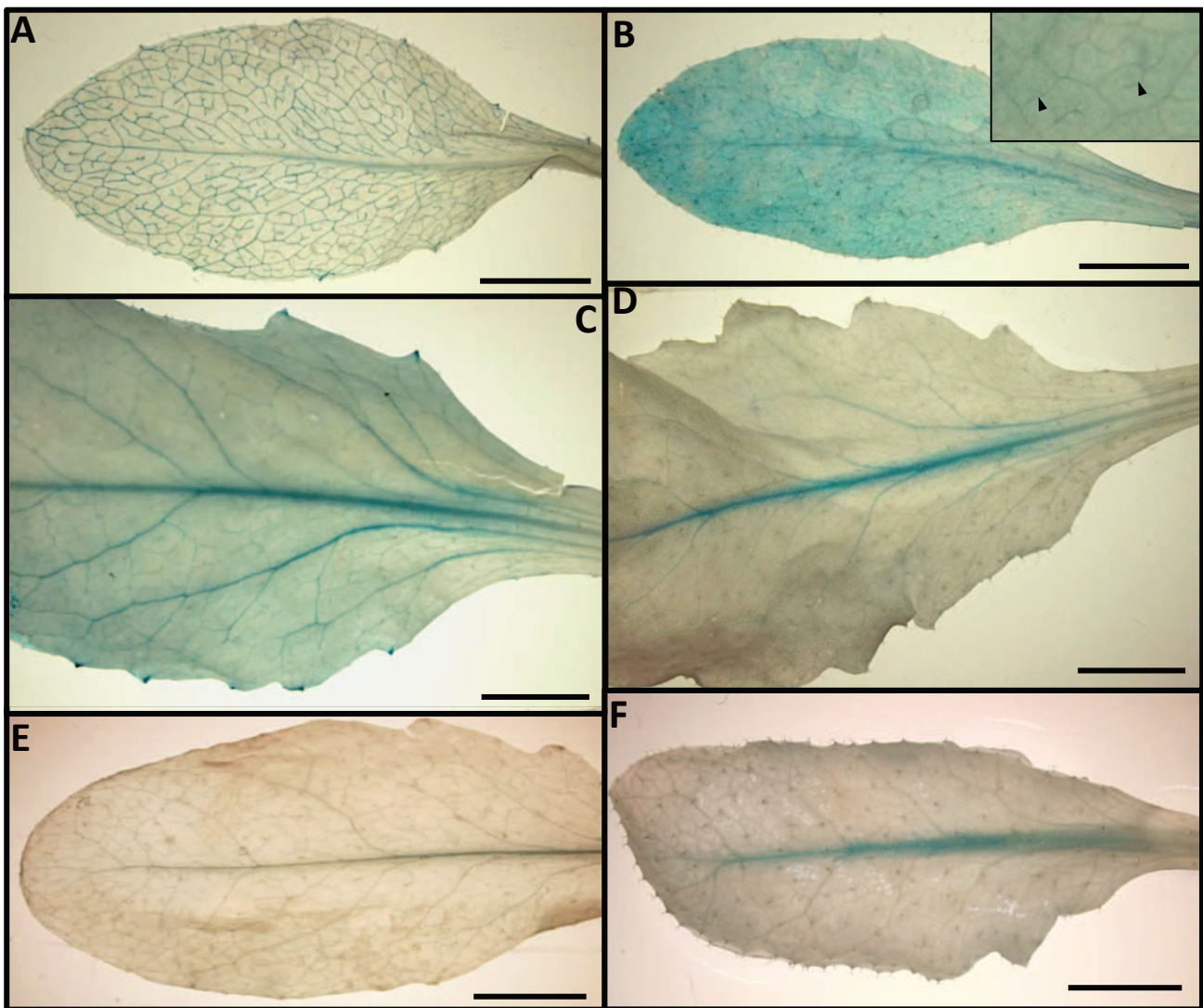


Figure II-5. GUS staining of *ProGLN1;x:uidA* transformants reveals specific *GLN1* expression patterns. Observation of GUS staining in leaves of 40 days old plants grown under high nitrate conditions (A-E). For *ProGLN1;4:uidA*, staining was also performed on 52 days old plants treated with 100 mM NaCl for 48 hours (F). *ProGLN1;1:uidA* (A); *ProGLN1;2:uidA* (B, insert); *ProGLN1;3:uidA* (C); *ProGLN1;5:uidA* (D) and *ProGLN1;4:uidA* (E, F). Scale bars: 5mm

N metabolism were performed on monocots. Transfer of knowledge to dicots, that could be especially interesting in the case of *Brassica napus*, which is a high N demanding plant, is impeded by the dichotomy existing in the phylogeny of the monocot and dicot *GS1* sequences (Lothier et al., 2011). Nevertheless, functional studies and especially expression analyses performed in maize (Martin et al., 2006); Hirel et al, 2007), rice (Ishiyama et al., 2004a; Yamaya and Kusano, 2014), wheat (Bernard et al., 2008b), barley (Goodall et al., 2013), rapeseed (Orsel et al., 2014) and Arabidopsis (Ishiyama et al., 2004b; Lothier et al., 2011) should facilitate the deduction of analogies between the different *GS1* genes from monocots and dicots and then facilitate hypothesis on common roles in nitrogen management.

In order to gain insights on the role of each *GLN1* gene in *B. napus*, we have decided to increase our knowledge on Arabidopsis, which is the closest model plant with small genome, and to provide a detailed picture of the expression patterns of each *AtGLN1* gene at plant, organ and sub-cellular levels. This study was performed comparing nitrate conditions and tissue ages.

Regarding nitrate conditions in which the different *GLN1* genes are expressed we found that *AtGLN1;1* and *AtGLN1;4* are induced by N limitation, in both leaves and stem, in accordance with the pattern previously found by Lothier et al, (2011) and with the expression observed for the *BnaGLN1;1* homologous genes of *Brassica napus* (Orsel et al., 2014). By contrast, we did not found in this study clear induction of the expression of *AtGLN1;2* by nitrate supply as found by Lothier et al. (2011). Growth conditions and rosette ages might be the reason why. The higher expression of *AtGLN1;2* previously reported by Lothier et al, (2011) was however consistent with the higher expression of the *BnaGLN1;2* homologous genes found in oilseed plant when grown under high nitrate conditions compared to low nitrate (Sun et al., 2010; Orsel et al., 2014). Surprisingly, our results even showed a clear induction of *AtGLN1;2* expression in old rosette under N limitation. One hypothesis is that this condition could trigger early senescence and so induce *AtGLN1;2* expression as described Diaz et al (2008). As such, the induction of *AtGLN1;4* and *AtGLN1;1* expressions under low nitrate is consistent with the fact that Guo et al (2004) found that these two genes are highly induced during leaf senescence. No nitrate effect on the expression of *AtGLN1;3* and *AtGLN1;5* could be detected in both rosette and stem by qPCR. However, GUS staining seemed to be a little more intense under high nitrate conditions but this technique only allowed to analyze the expression of *AtGLN1;3* promoter, lacking potential post-transcriptional regulation. A little more important expression level could also be detected in flowers under high nitrate for *AtGLN1;5*.

Expression of the different *AtGLN1* genes under low or high nitrate supplies should be consistent with their roles in plant tissues under such conditions. We can indeed observe that the

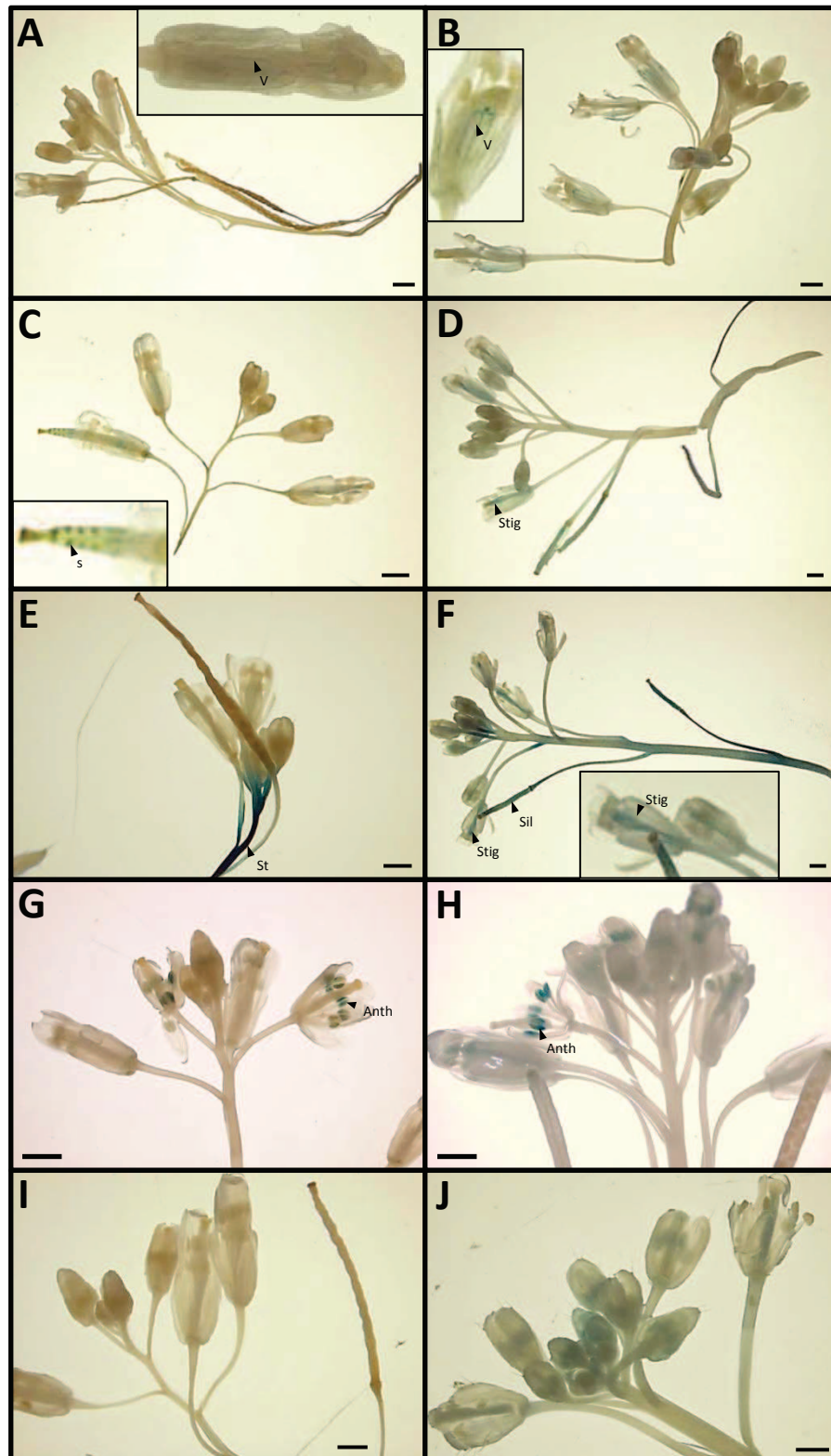
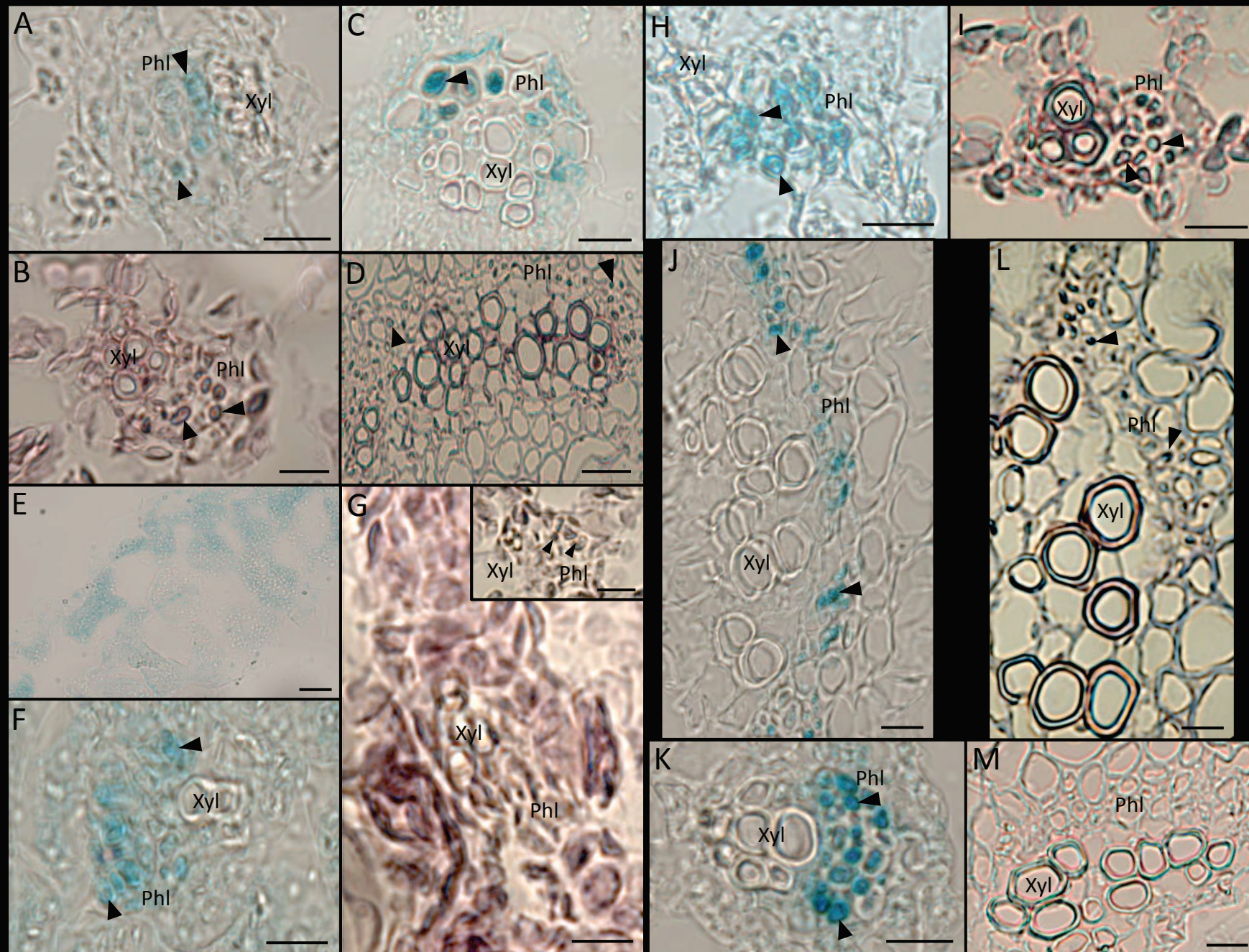


Figure II-6. GUS staining of the flowers of *ProGLN1;x:uidA* transformants. Observation of GUS staining in flowers of 40 days old plants grown under low (A, C, E, G, I) or high (B, D, F, H, J) nitrate conditions. (A, B) *ProGLN1;1:uidA*. (C, D) *ProGLN1;2:uidA*. (E, F) *ProGLN1;3:uidA*. (G, H) *ProGLN1;4:uidA*. (I, J) *ProGLN1;5:uidA*. Anth: anther. S: seeds. St: stem. Stig: stigmata. Sil: silique. V: petal vein. Scale bars: 1mm

two AtGLN1;1 and AtGLN1;4 enzymes, whose genes are overexpressed under low nitrate conditions, have consistently been described as high affinity enzymes for ammonium by Ishiyama et al, (2004b). By contrast, AtGLN1;2 and AtGLN1;3 enzymes were found as low affinity enzymes for ammonium which suggests roles under high nitrate conditions and is consistent with higher expression under high nitrate supplies or ammonium excess (Ishiyama et al., 2004b; Lothier et al., 2011).

Responses to nitrate, sugar or ammonium were also monitored on plants grown *in vitro*. Ammonium triggering effect on AtGLN1;2 expression have been reported previously by Ishiyama et al. (2004b) and Lothier et al. (2011) and this study confirms it. We also observed as strong induction of AtGLN1;3 by ammonium in roots and shoot and of AtGLN1;1 only in shoot. By contrast, AtGLN1;4 was repressed by ammonium in shoot and AtGLN1;5 was repressed in both shoot and roots. Up regulation of AtGLN1;1, AtGLN1;2 and AtGLN1;3 by ammonium suggests that these three isoforms might be important for ammonium detoxification while AtGLN1;4 and AtGLN1;5 are certainly not. The strong induction of AtGLN1;4 in roots and shoot when nitrate is absent from the medium rather suggests a role under severe starvation. Finally, the large induction of AtGLN1;5 by sugar deprivation in shoot was quite specific to this gene and as AtGLN1;5 has been previously mainly associated to seeds, such response could be related to osmotic response rather than to nutrient effect.

Many reports present *GS1* genes as senescence associated genes (Guo et al., 2004; Masclaux-Daubresse et al., 2005). We studied here gene expression in the whole rosette and not in specific leaf rank throughout development. We anyway found AtGLN1;1 induced by ageing, in both rosettes and stem in accordance with pattern of expression previously described and with the senescence effect observed for the *BnaGLN1;1* homologues of *Brassica napus* (Orsel et al., 2014). AtGLN1;2 was also induced by ageing in rosettes grown under short days. The expression of this gene is known to increase in mature leaves and to decrease after during senescence (Diaz et al., 2008; Lothier et al., 2011; Orsel et al., 2014). It is probable that for long day rosettes, plant material was harvested either before or after the peak of expression then masking age effect. In our study, AtGLN1;3 is slightly although significantly induced by ageing in rosettes, which is consistent with the fact that this genes has not be reported as senescence related previously. AtGLN1;4 was commonly used as a senescence marker, as a low nitrate responding gene as well as a sugar inducible marker (Guo et al., 2004; Pourtau et al., 2006; Wingler et al., 2009). Accordingly, we observed induction of AtGLN1;4 by ageing in rosettes grown under short day and low nitrate and in stems. However, regarding Pourtau et al. (2006), it was surprising to detect an induction of the expression of AtGLN1;4 under sucrose deprivation. The *BnaGLN1;4* homologues of *Brassica napus* are also induced by senescence in vegetative tissues (Orsel et al., 2014). AtGLN1;5 expression was barely not detectable in vegetative tissue and no difference can then be detected during ageing.



Beside expression in rosettes and stems, we also observed strong expressions of *AtGLN1;1*, *AtGLN1;2*, *AtGLN1;3*, and *AtGLN1;5* in flowers. A role in generating glutamine to support reproducing organs, seed development and later grain filling can then be hypothesized.

Thanks to *in situ* hybridization and promoter::*uidA* fusions we were able to go deeper in the study of *AtGLN1* expressions. From both approaches, we found that all the *AtGLN1* genes are expressed in the phloem tissues and more specifically in small cells that are certainly companion cells. Presence of *AtGLN1;2* protein in companion cells of stems has been reported by Lothier et al. (2011). In addition to phloem localization we also observed expression of *AtGLN1;2* in the mesophyll cells of old and mature leaves and *AtGLN1;3* expression was also localized in hydathodes. Interestingly, expression of *AtGLN1;3* in hydathodes suggests that this isoform is probably the one responsible for the synthesis of the glutamine excreted by these organs in the glutamine dumper (*Gdu1* overexpressing) lines described by Pilot et al, (2004).

Regarding phloem localization, the analysis of the expression of the *promoterAtGLN1::uidA* fusions showed that the expressions of all the *GLN1* genes are located in different veins. *AtGLN1;1* was merely detected in secondary, tertiary and quaternary veins. Beside its strong expression in mesophyll tissues, *AtGLN1;2* was also expressed in tertiary and quaternary veins. *AtGLN1;3* was mainly expressed in primary vein and also, although in a lower extend, in secondary veins. *AtGLN1;4* was undetectable under normal condition but was localized in the primary vein when salt stress was applied. Finally, *AtGLN1;5* was mainly detected in the primary veins. Such different and complementary expression patterns then suggest that all the *GLN1* isoforms participate in the different steps of N translocation within the vein network of the leaf. Glutamine formation in mature leaf mesophyll by *AtGLN1;2* certainly assists the chloroplastic *AtGLN2* in nitrogen primary assimilation when nitrate supply to the plant is high. It can also participate to nitrogen remobilization from mesophyll cells and replace progressively *AtGLN2* to assimilate ammonium during leaf senescence. The three *GLN1;1*, *GLN1;2* and *GLN1;4* would in addition participate in glutamine loading to the phloem of minor veins (Haritatos et al., 2000a; Haritatos et al., 2000b) while *GLN1;3* and *GLN1;5* would be in charge of glutamine synthesis and translocation in the main veins.

Figure II-7. Transverse sections of leaves showed differential *GLN1* expression in vascular tissues. GUS staining of *ProGLN1;x:uidA* transformants (A;C;E;F;H;J;K) were used as well as *in situ* hybridization with antisense probes labeling mRNA (B;D;G;I;L). *ProGLN1;1:uidA* (A). *AtGLN1;1* antisense probe (B). *ProGLN1;3:uidA* (C). *AtGLN1;3* antisense probe (D). *ProGLN1;2:uidA* (E;F). *AtGLN1;2* antisense probe (G, insert). *ProGLN1;4:uidA* (H). *AtGLN1;4* antisense probe (I). *ProGLN1;5:uidA* (J;K). *AtGLN1;5* antisense probe (L). Negative control, *in situ* performed without probe (M). Arrows indicate some labeled companion cells. Scale bars: 10 µm for A, B, C, F, G, H, I, J and K and 20 µm for D, E, L and M. Xyl: xylem. Phl: Phloem.

A

Plantlets

Control medium

 NH_4^+ stress

GLN1;1
GLN1;2
GLN1;3
GLN1;4



GLN1;1
GLN1;2
GLN1;3
GLN1;4

GLN1;1
GLN1;2
GLN1;3
GLN1;4

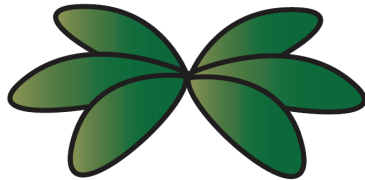
GLN1;1
GLN1;2
GLN1;3
GLN1;4

B

Low N

High N

GLN1;1
GLN1;2
GLN1;3
GLN1;4



GLN1;1
GLN1;2
GLN1;3

Vegetative stage

C

Low N

GLN1;1
GLN1;2
GLN1;3

GLN1;1
GLN1;2
GLN1;3

High N

GLN1;5

GLN1;5

GLN1;1
GLN1;2
GLN1;3
GLN1;4

GLN1;1
GLN1;2
GLN1;3
GLN1;4

GLN1;1
GLN1;2
GLN1;3
GLN1;4

GLN1;1
GLN1;2
GLN1;3
GLN1;4

GLN1;1
GLN1;2
GLN1;3
GLN1;4

GLN1;1
GLN1;2
GLN1;3



GLN1;1

GLN1;1

Reproductive stage

Figure II-8. Schematic representation of *GLN1* genes in plantlets (A), at vegetative stage (B) and reproductive stage (C). Respective expression levels are indicated by the size of the font. Large size is for high expression levels, small size for low expression levels.

Such vascular localization is not a surprise as several GS1 proteins had been localized using immunolocalization in veins of many plant species and, for instance, rice (Kamachi et al., 1992; Sakurai et al., 2001), wheat (Bernard et al., 2008b), tobacco (Dubois et al., 1996) and barley (Goodall et al., 2013). The immunolocalization with GS antibodies presented here had not enough resolution to examine specifically vein tissues in leaves. However, such approach has previously allowed us to localize GLN1;2 in companion cells of stems comparing wild type and mutants (Lothier et al., 2011). Surprisingly, in both Lothier et al. (2011) and this study, we observed, using immunolocalization with our GS antibodies, a strong signal in the cambium cells of leaves and stems. However, the *in situ* hybridizations and *promoterGLN1::uidA* fusions cannot explain this cambium signal by the presence of one of the five GLN1 isoforms studied. The lonely hypothesis we can propose is that our GS antibody can recognize another GLN1 isoform that has not been yet characterized (Ghoshroy et al., 2010; Swarbreck et al., 2011) or another protein presenting similar epitope.

As a summary, Figure II-8 presents a global picture of the location and potential roles of the five AtGLN1 isoforms in Arabidopsis. To summarize, *AtGLN1;1* is expressed in both vegetative and reproductive tissues and appears to be the main isoform in roots, particularly under low nitrate conditions. *AtGLN1;1* is induced by ageing and by ammonium treatment in the shoot. The main role of *AtGLN1;2* might be about ammonium detoxification in roots as its expression is strongly induced by ammonium treatment in this part of the plant. However, *AtGLN1;2* is also expressed in mesophyll suggesting a role in N metabolism in mature leaves. *AtGLN1;3* is expressed at a quite basal level in all parts of the plant but is more important in flowers. However, ammonium treatment induced its expression in roots and more significantly in shoot where it might participate to ammonium detoxification with *AtGLN1;1*. As a marker of senescence, *AtGLN1;4* is more expressed in old tissue, and is also induced by N limitation. *AtGLN1;5* expression is restricted to primary vein and flowers. This gene might participate in the delivering of N to sink tissue. Finally, all the Arabidopsis *GLN1* genes are expressed in phloem companion cells, all along the vascular system, highlighting the important role of these genes in N translocation and notably N remobilization (Figure II-9).

This study and previous studies in Arabidopsis or other species (Ishiyama et al., 2004b; Tabuchi et al., 2005; Lothier et al., 2011; Goodall et al., 2013; Orsel et al., 2014) described distinct patterns of expression for each *GLN1* genes which can be explained by independent transcriptional regulations. GS1 mRNA levels are known to be regulated by light, carbon availability and amino acids (Oliveira and Coruzzi, 1999). GS1 expression is increased by sucrose and glutamate (Masclaux-Daubresse et al., 2005) but the ratio between glutamate and glutamine could also be of high importance in the regulation of GS1 expression (Watanabe et al., 1997). Response of *GS1* genes to N limitation or ammonium as N source is also known in other species (Caputo et al., 2009; Goodall et al., 2013). In

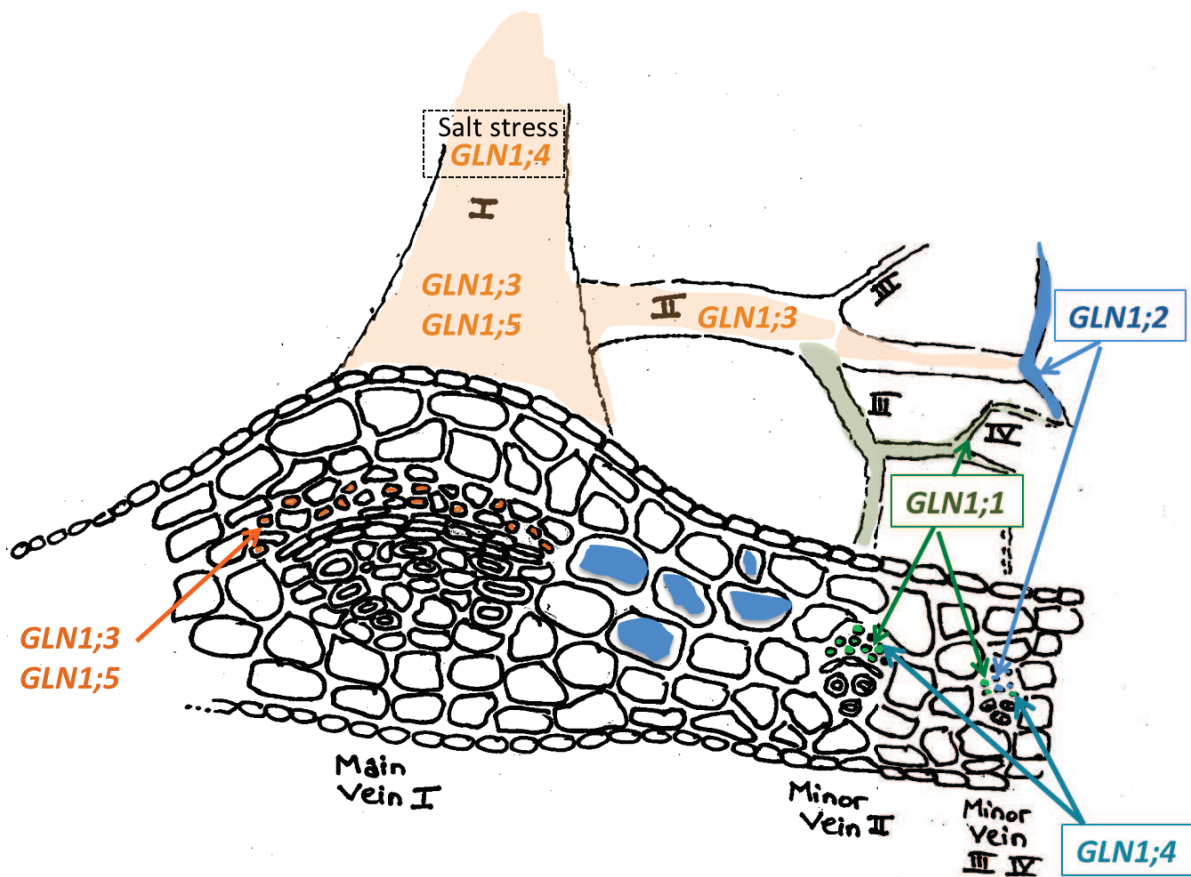


Figure II-9. Schematic representation of *GLN1* expression patterns in veins. *AtGLN1;1* is detected in secondary, tertiary and quaternary veins, *AtGLN1;2* in tertiary and quaternary veins but also in mesophyll cells, *AtGLN1;3* in primary and also at a lower level in secondary veins, *AtGLN1;4* at low level in minor veins and in the primary vein when salt stress is applied. Finally, *AtGLN1;5* is mainly detected in the primary vein.

addition, it was shown that the regulation of GS1 expression also occurs at post-transcriptional and post-translational level (Thomsen et al., 2014). Both 5' and 3' untranslated regions (UTR) were shown to be involved in the post-transcriptional regulation of a soybean GS where the 5'UTR acts as a translational enhancer (Ortega et al., 2012) whereas the 3'UTR is involved in transcript stability and translation level (Ortega et al., 2006). In rapeseed, post-translational regulation of GS *via* phosphorylation and interaction with 14-3-3 proteins in senescing leaves was reported (Finnemann and Schjoerring, 2000). AtGLN1;1 was also found to be phosphorylated by AtCRK3, a calcium dependent kinase (Li et al., 2006). Thus, the regulation of GS1 activity is occurring at several levels. This multi-level control of GS can explain some discrepancies found in this study between results obtained by qPCR and GUS techniques, as the later one lacks the post-transcriptional control level compared to the first one. In this study, we analyzed the expression of *GLN1* genes and were, therefore, only able to detect the effects of transcriptional and post-transcriptional regulation. It would also be interesting to analyze, in the future, post-translational modifications involved in the regulation of the GLN1 isoforms.

The partial overlapping of the expressions of the five *AtGLN1* suggests that it will be difficult to assign role for each gene. In addition, a recent report showed that isoforms can interact between them in order to form heterodecamers (Dragicevic et al., 2014). Therefore, this study and Dragićević et al, (2014) suggest that the combination of several *Atgln1* mutations in a same plant could be necessary to find out the roles of the *GLN1* genes in N metabolism. Our study facilitates the choice of mutation to combine as well as the growth conditions needed to phenotype the different mutants. In addition, the similarities in the expression patterns of the *AtGLN1* and *BnaGLN1* genes suggest that a transfer of knowledge is possible from the model plant *Arabidopsis* to oilseed rape.

III Remobilisation de l'azote dans les mutants des glutamine synthétases cytosoliques chez *Arabidopsis thaliana*

1) Introduction

During the second half of the 20th century, the “green revolution” facilitated the development of high-yielding crop plants (Pingali, 2012) with the counterpart that modern agriculture became dependent on the high amounts of nitrogenous fertilizers annually applied by farmers (Good et al., 2004), which represent the major part of production costs (Singh, 2005). Nitrogen (N) is a fundamental element for plants but it was shown that only 50% to 70% of N applied on crops is retrieved in seeds (Good et al., 2004). The important N loss in the environment results in pollution. With the estimated increase of worldwide population and the fact that more and more land will be used for biofuel production, varieties with a better Nitrogen Use Efficiency (NUE) are needed (Hirel et al., 2007). NUE is differently defined depending in crops grown for seeds and in crops grown for biomass but common mechanisms control it. N is taken up from the soil, transported and assimilated into organic compounds which are, later, recycled from the mature leaves to the developing ones during sequential senescence. N is further remobilized to support grain filling during monocarpic senescence (Masclaux-Daubresse et al., 2008). N recycling and remobilization are of special interest because they allow the plant to save and re-use organic N already present in their vegetative parts. Depending on the plant species and N availability in the environment, N uptake capacities were found to vary greatly (from a drastic decrease in N uptake to the continuation of a high uptake) after anthesis, also depending on the study in the same species (Rossato et al., 2001; Malagoli et al., 2005a; Kichey et al., 2007). The N taken up from the soil after anthesis is not necessarily allocated to the seeds and N remobilization is often the main source of nitrogen to cope with the strong demand of grain filling (Chardon et al., 2012).

Oilseed rape is the predominant oil crop in Northern Europe, and is cultivated for oil-rich seeds. Negative correlation between oil and N content in seeds is well known so a better knowledge of NUE in this species is required. Indeed, rapeseed has a low NUE (Rathke et al., 2006) despite good uptake capacities at vegetative stage (Malagoli et al., 2004). Rossato et al (2001) showed that rapeseed can lose up to 15% of its total N content by leaf drop during sequential senescence leading to a bad Nitrogen Remobilization Efficiency (NRE) with the consequence that only 50% of applied N is retrieved in seeds (Schjoerring et al., 1995). Thus, study of N remobilization in this species and the enzymes involved in that process are of special interest.

It is well known that remobilization of nutrient to the seeds is concomitant with senescence (Masclaux-Daubresse et al., 2008). In senescent leaves, chloroplastic proteins (mainly Rubisco and other photosynthetic related proteins) are the main source of nitrogen. Proteolysis releases ammonium and glutamate, which are reassimilated by cytosolic glutamine synthetase (GS1) and asparagine synthetase (AS) to form glutamine and asparagine. These two amino acids are also major constituents of the phloem saps in several species (Hunt et al., 2010a; Lohaus and Schwerdtfeger, 2014) and their concentrations in phloem saps increase during senescence (Feller and Fischer, 1994). As the ratio of GS1 and GS2 (chloroplastic glutamine synthetase) activities increases during senescence in parallel with the expression of some of the GS1 encoding genes (Guo et al., 2004; Orsel et al., 2014), it seems that glutamine synthesis in the cytosol is a key step for N remobilization.

The cellular localization of the GS1 isoforms was studied in several species. GS1 genes were usually found expressed in the vasculature of plants. *GLN1* transcripts were localized in the parenchyma and inner bundle sheath cells surrounding the vasculature in wheat (Bernard et al., 2008a), in bundle sheath cells in maize (Martin et al., 2006), in vascular bundles or bundle sheath cells in barley (Goodall et al., 2013), and in phloem companion cells in tobacco (Dubois et al., 1996), rice (Sakurai et al., 1996) and Arabidopsis (Lothier et al., 2011; Moison et al., unpublished results). All together, these data suggest a role of GS1 in the remobilization of nitrogen.

72

To date, all studies performed in order to unravel the role of GS1 encoding genes revealed multigenic families and functional analyses were limited to few species. In rice, three genes *OsGS1* have been identified. Mutation of *OsGS1;1* and *OsGS1;2* gene both led to productivity defects such as biomass and grain filling reduction (Tabuchi et al., 2005) and biomass and panicle number reduction (Funayama et al., 2013), respectively. In maize, *Gln1-3* and *Gln1-4* are both expressed in leaves and their knock-out mutants (*gln1-3* and *gln1-4*) both show lower productivity, with reduced kernel number and size, respectively (Martin et al., 2006). In addition to this limited number of functional analyses using reverse genetics approaches, some QTL (Quantitative Trait Loci) analyses on maize and rice highlighted the link between GS1, N management, growth rate and agronomic traits such as yield and grain filling (Hirel et al., 2001; Obara et al., 2004), as GS1 structural genes colocalized with QTLs for those traits. However, none of the studies performed up to now, except Lothier et al. (2011), has investigated the role of GS1 isoforms in N remobilization using ^{15}N tracing approaches.

GLN1 multigenic family is complex in rapeseed with 16 genes showing high sequence similarities and redundant patterns of expression (Orsel et al., 2014). Consequently, studies about GS1 role in N remobilization are difficult. However, a transfer of knowledge might be possible

Table III-S1: mutant lines used in this study

<u>Mutant name</u>	<u>Mutant line</u>	<u>Mutant collection</u>	<u>Gène (AGI number)</u>
<i>gln1;1a</i>	GK-265C09	GABI-Kat	<i>GLN1;1</i> (At5g37600)
<i>gln1;1b</i>	SAIL_1273_A10	SAIL	
<i>gln1;3a</i>	SALK_072283	Salk	<i>GLN1;3</i> (At3g17820)
<i>gln1;3b</i>	SALK_038156	Salk	
<i>gln1;4a</i>	SALK_147053	Salk	<i>GLN1;4</i> (At5g16570)
<i>gln1;4b</i>	SALK_039770	Salk	
<i>gln1;4c</i>	SALK_7138c	Salk	
<i>gln1;5a</i>	SALK_086579	Salk	<i>GLN1;5</i> (At1g48470)

between Arabidopsis and rapeseed as we identified similarities of expression patterns between Arabidopsis *GLN1* genes and their homologues in *Brassica napus* (Orsel et al., 2014).

The aim of this work was then to study the role of each *GLN1* genes in Arabidopsis nitrogen metabolism. We used the ^{15}N labeling technique to phenotype *gln1* simple knock-out mutants and, then, assess the role of each GS1 isoform in N remobilization.

2) Materials and methods

Plant material

T-DNA mutant lines from Salk or GABI collections (Table III-S1) obtained from Nottingham Arabidopsis Stock Center, were backcrossed with their wild-type and genotyped using PCR (see below). The absence of transcript was monitored using RT-PCR (see below). Wild-type Arabidopsis plants (Col-8 accession: N60000, Salk) were used as control.

Mutant genotyping and characterization

Genomic DNA was isolated from mutant leaf tissue using the protocol described by Edwards et al. (1991). Total RNA were isolated from mutants and WT using the TRIzol® reagent (Life technologies, Saint-Aubin, France) according to manufacturer's guidelines and then used for reverse transcription by the M-MuLV reverse transcriptase (ThermoFischer Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) and oligo(dT) (Eurofins MWG operon, Ebersberg, Germany). Contaminating DNA was removed by DNaseI treatment (ThermoFischer Scientific, Villebon-sur-Yvette, France).

For both genotyping and verification of the absence of transcripts, PCR assay was performed on 3 μL of genomic DNA or cDNA, respectively, isolated as described above, in a final volume of 20 μL . PCR mixture contained 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH8.8), 1.5mM MgCl_2 , primers at 0.5 μM and 0.5 unit of Taq polymerase (ThermoFischer Scientific, Villebon-sur-Yvette, France). Thermal cycling was as follow: 5 min at 95°C, followed by 30 cycles of 45 s at 95°C, 45 s at 55°C, 1 min at 72°C, and 10 min at 72°C. PCR products were visualized on 1% agarose gel (in 0.5X Tris Acetate EDTA buffer) stained with ethidium bromide. The primers used for genotyping and RT-PCR are listed in Table III-S2.

Growth conditions for phenotyping experiments

Phenotyping experiments associated several light, photoperiod and nitrogen supply conditions. Plants were grown on soil under low or high nitrate conditions (2 mM and 10mM NO_3^- , respectively, according to (Lemaitre et al., 2008)) under short days (8 hours light) or long day (16 hours light) and 150 μmol of photons $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Under long days high light (450 μmol of photons $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)

Table III-S2: List of primers used in this study

Name	Gene	Sequence (5' → 3')	Use
gln1;1a-F (P1)	<i>GLN1;1</i> (At5g37600)	TATTGGTGGTTATCCCGCCCC	genotyping of <i>gln1;1a</i> mutant, RT-PCR
gln1;1a-R (P2)	<i>GLN1;1</i> (At5g37600)	TTG ATC CCA GCG TAT AAG CAG GCC	genotyping of <i>gln1;1a</i> mutant
gln1;1b-F (P3)	<i>GLN1;1</i> (At5g37600)	CACAGAGATTGCTGGTGTAGTGG	genotyping of <i>gln1;1b</i> mutant, RT-PCR
gln1;1b-R (P4)	<i>GLN1;1</i> (At5g37600)	TCGAAGCTGGCCTCCTGTCC	genotyping of <i>gln1;1b</i> mutant, RT-PCR
gln1;2a-F (P5)	<i>GLN1;2</i> (At1g66200)	GCGGGAGAGCCAATCCCTACTAACAAGCG	genotyping of <i>gln1;2a</i> mutant
gln1;2a-R (P6)	<i>GLN1;2</i> (At1g66200)	CCG AAT TTG CTC TAA CCA CAG AAC CC	genotyping of <i>gln1;2a</i> mutant
gln1;3a-F (P7)	<i>GLN1;3</i> (At3g17820)	CGTTAACCTCAACCTC	genotyping of <i>gln1;3a</i> mutant
gln1;3a-R (P8)	<i>GLN1;3</i> (At3g17820)	TCC TTG GCA ACG TCG GGG	genotyping of <i>gln1;3a</i> mutant
gln1;3b-F (P9)	<i>GLN1;3</i> (At3g17820)	CAGCCACCCCGACGTTGCC	genotyping of <i>gln1;3b</i> mutant, RT-PCR on <i>gln1;3</i> mutants
gln1;3b-R (P10)	<i>GLN1;3</i> (At3g17820)	GTG TCA TCA ACC GAG TAT GG	genotyping of <i>gln1;3b</i> mutant, RT-PCR on <i>gln1;3</i> mutants
gln1;4a-F (P11)	<i>GLN1;4</i> (At5g16570)	GTGACGCATATACACCGGC	genotyping of <i>gln1;4a</i> mutant
gln1;4a-R (P12)	<i>GLN1;4</i> (At5g16570)	CGACCGGCCAACCTACCGGCC	genotyping of <i>gln1;4a</i> mutant
gln1;4b-F (P13)	<i>GLN1;4</i> (At5g16570)	GGAGATTGGAATGGTGCAGGGGCAC	genotyping of <i>gln1;4b</i> and <i>gln1;4c</i> mutant, RT-PCR
gln1;4b-R (P14)	<i>GLN1;4</i> (At5g16570)	GCCCAACCCTAATCGATGCCCCACGG	genotyping of <i>gln1;4b</i> and <i>gln1;4c</i> mutant, RT-PCR
gln1;5a-F (P15)	<i>GLN1;5</i> (At1g48470)	CCAGGACCAGTAAGTAATCC	genotyping of <i>gln1;5a</i> mutant, RT-PCR
gln1;5a-R (P16)	<i>GLN1;5</i> (At1g48470)	GGAATTGGATCTCCGGCCGG	genotyping of <i>gln1;5a</i> mutant
LB3	T-DNA	TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATACAC	genotyping of SAIL mutant lines
LBa1	T-DNA	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	genotyping of SALK mutant lines
GABI8409	T-DNA	ATATTGACCATCATACTATTGC	genotyping of GABI mutant lines
RTgln1;1a-R	<i>GLN1;1</i> (At5g37600)	TCAGCCCTTTTAAGATAATGTTTATTC	RT-PCR on <i>gln1;1a</i> mutant, reverse primer
RTgln1;4b-F	<i>GLN1;4</i> (At5g16570)	GAGAAGATGGAGGGTACGAGG	RT-PCR on <i>gln1;4b</i> mutant, forward primer
RTgln1;4b-R	<i>GLN1;4</i> (At5g16570)	GGTTTCCAAAGGATTGT	RT-PCR on <i>gln1;4b</i> mutant, reverse primer
RTgln1;4c-F	<i>GLN1;4</i> (At5g16570)	CAAGACCCTAGTGTGTGCGCCG	RT-PCR on <i>gln1;4c</i> mutant, forward primer
RTgln1;5a-R	<i>GLN1;5</i> (At1g48470)	GAATGAGACAATCACACCGC	RT-PCR on <i>gln1;5a</i> mutant, reverse primer

was also assayed. Pot size and number of plants per pot were either as described in Lemaître et al. (2008) or smaller (27 mm square and 40 height) and in that case, only one plant per pot was sown.

¹⁵N tracing experiment

Plants were also grown on sand under low or high nitrate supplies (2 mM and 10mM NO₃⁻, according to (Masclaux-Daubresse and Chardon, 2011) under short days. Plants were watered three times a week with the non-labeled nutritive solutions in which ¹⁵N is only present at the natural abundance level. Plants were labeled with nutritive solutions enriched at 2.5% (w/w) of ¹⁵NO₃ for ¹⁵N uptake analysis and at 5% (w/w) of ¹⁵NO₃ for ¹⁵N remobilization analysis. The labeling was performed during 24 hours at vegetative stage (42 days after sowing (DAS)), in order to ensure that all the ¹⁵N taken up from the soil is assimilated by the plant before flowering. The four rosettes labeled with 2.5% (w/w) of ¹⁵NO₃ were harvested for each genotype immediately at the end of the labeling time and frozen for further experiments. The labeling of the plants with 5% (w/w) of ¹⁵NO₃ was stopped after 24 h of watering with the labeled solution and sand and roots were carefully rinsed in order to eliminate as much as possible the ¹⁵N source from the substrate. Plants were then grown until the end of their life cycle and complete drying before harvesting of the different compartments (rosette, seeds and dry remains (stem, siliques, cauline leaves)). After labeling, and until the end of the life cycle, plants were watered with non-labeled nutritive solution and transferred 56 DAS into long days photoperiod.

Determination of Total N Content and ¹⁵N Abundance and Partition

In the labeling experiment, after drying and weighing each plant part, material was ground to obtain homogenous fine powder. A subsample of 1,000 to 2,000 mg was carefully weighed in tin capsules to determine total N content and ¹⁵N abundance using an elemental analyzer (EA3000, EuroVector, Milan, Italy) coupled to an isotope ratio mass spectrometer (Horizon, Nu Instruments, Wrexham, UK) calibrated measuring natural abundance. The ¹⁵N abundance of samples was calculated as atom percent and defined as $A\% = 100(^{15}\text{N}) / (^{15}\text{N} + ^{14}\text{N})$ for labeled plant samples and for unlabeled control plants (Acontrol% was 0.36052). The ¹⁵N enrichment of the plant material was then defined as (Asample% - Acontrol%). The absolute quantity of ¹⁵N contained in the i sample was $Q_i = \text{DW}_i (A_i\% - A_{\text{control}}\%) \%N_i$, with $\%N_i = [\text{mg N} \times (100 \text{ mg DW}_i)]^{-1}$. The Q value of the whole plant can be measured and $Q_{\text{wp}} = \sum Q_i$. The partition P% of ¹⁵N in the organ i was calculated as $P\%(^{15}\text{N})_i = [(A_i\% - A_{\text{control}}\%) \text{DW}_i \%N_i] / [(A_{\text{wp}}\% - A_{\text{control}}\%) \text{DW}_{\text{wp}} \%N_{\text{wp}}] = Q_i / Q_{\text{wp}}$.

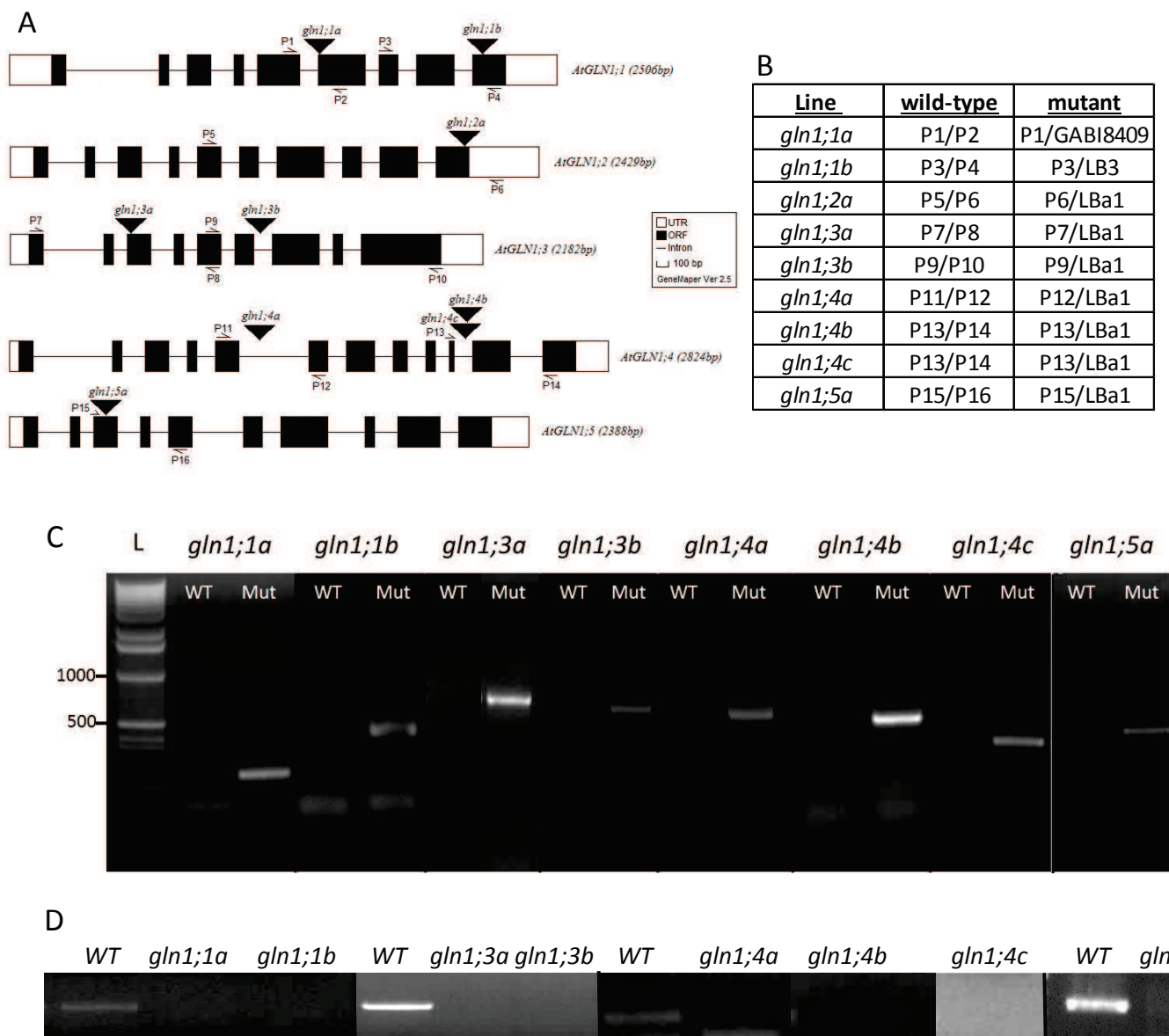


Figure III-1. Characterization of *gln1* knockout mutants. (A) Structure of Arabidopsis *GLN1* genes. Position of T-DNA insertions are indicated for each mutant line. Primers used in this study are indicated by small arrows. (B) Primers couples used for genotyping of *gln1* mutant line in order to detect wild-type or mutant allele. (C) Genotyping of homozygous *gln1* mutant lines. Amplification was only observed with primers couples aimed at amplifying mutant allele. (D) RT-PCR showing on mutant lines : transcripts could not be detected compared to wild-type.

3) Results

Characterization of *gln1* simple mutants

In order to investigate the role of *GLN1* genes in N metabolism under low and high nitrate supplies, simple mutants were isolated from GABI-Kat (Kleinboelting et al., 2012), Sail (Sessions et al., 2002) or Salk (Alonso et al., 2003) T-DNA libraries. Mutant lines are listed in Table III-S1. Exons/introns structures of *GLN1* genes are presented in Figure 1A, with T-DNA insertions and primers positions. Each line was isolated after backcrossing with Col-0 accession and analysis of segregation by PCR to detect homozygous lines (Fig. III-1C). Each line showed no amplification with primer couples supposed to detect wild-type allele (WT) whereas amplification products were obtained using one gene specific primer and a T-DNA specific one (Mut) (Fig. III-1B). The absence of corresponding transcripts in mutant lines was assessed by RT-PCR (Fig. III-1D), in leaf tissue for all lines except *gln1;5a* for whom expression analysis was performed on flowers. A list of the primers used in this study is available in Table III-S2. Two mutant lines were obtained for *GLN1;1* and *GLN1;3* genes whereas three and only one mutant lines were obtained for *GLN1;4* and *GLN1;5* respectively.

Plant phenotype of *gln1* simple mutants is not different from wild type

Mutants were grown under low or high nitrate supplies (2 and 10 mM NO₃⁻, respectively) in order to look for growth or developmental defects that can occur in mutants compared to wild-type plants. Growth conditions combined short and long day photoperiod with low and high nitrogen supply. High light under long day photoperiod was also used to observe the phenotype of the *gln1* mutants. The monitored traits were biomass, rosette size and flowering time together with senescence and anthocyanin accumulation. Unfortunately, no difference of phenotype could be found between wild type Col-0 and the *gln1* simple mutants in all the tested conditions (Fig 2A; other growth conditions than Fig 2A are not shown).

Mutants biomass and harvest index are not significantly different from wild type

Plants were labelled at early stages of plant development like done previously by Lothier et al. (2011) in order to ensure that all the ¹⁵N taken up from the soil is assimilated by the plant. Analysis of ¹⁵N uptake capacities of mutant lines was performed on plant samples harvested immediately after the labeling whereas the analysis of ¹⁵N remobilization was performed of dried plants harvested at the end of their life cycle and for whom the different compartments of the plant were separated (rosette, seeds and flowering stem (stem, siliques, cauline leaves)).

A

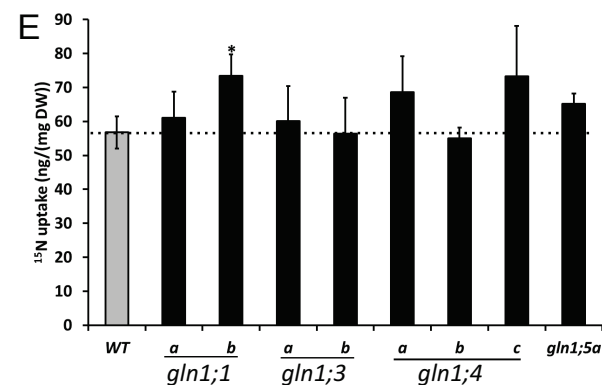
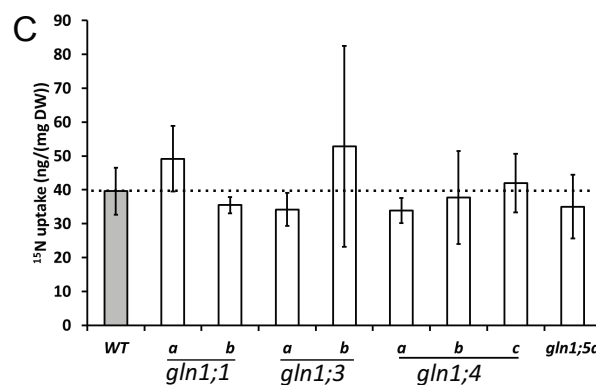
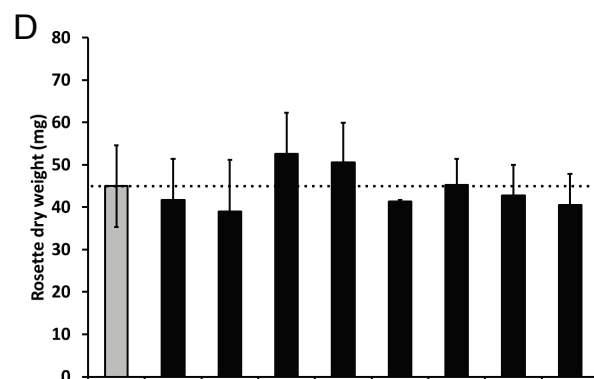
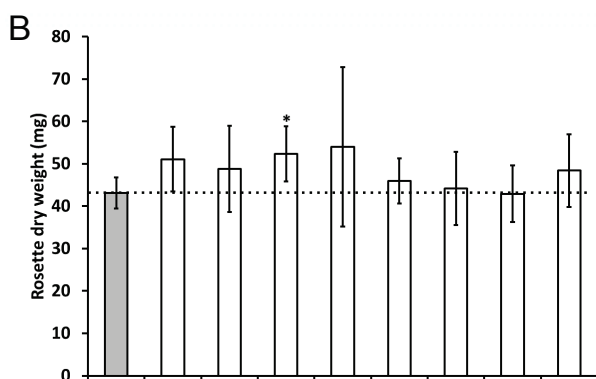
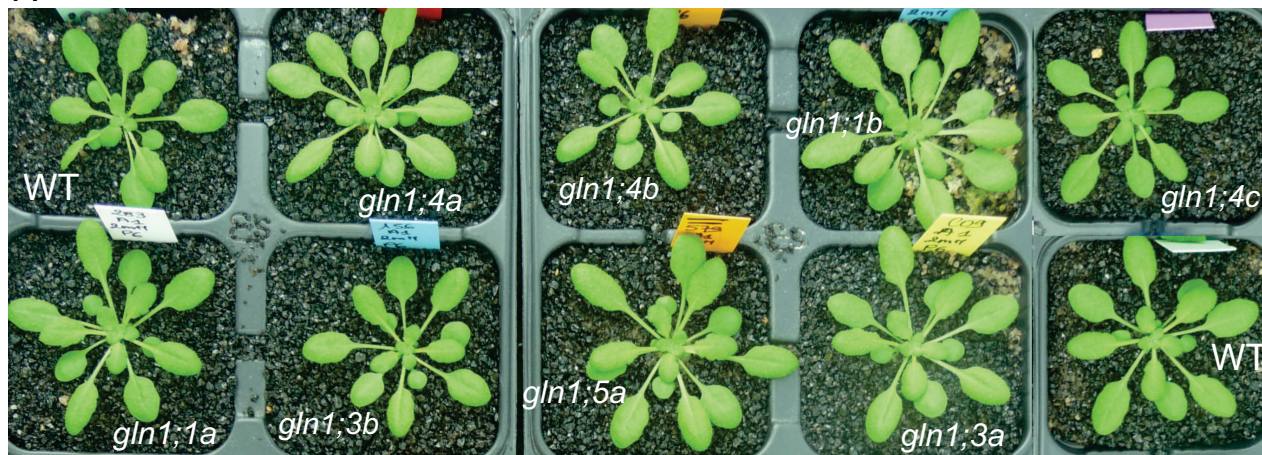


Figure III-2. Nitrogen uptake and plant biomass of *gln1* mutants are not different from wild type 42 days after sowing. (A) Phenotype of plants grown under low N are shown. (B, D) Dry weight of rosettes after 24h of ¹⁵N labeling (43 DAS). (C, E) ¹⁵N uptake in the *gln1* mutants and wild-type is measured as ng ¹⁵N per mg DW. Plants were grown under low N (white bars; B, C) and high N (black bars; D, E) conditions. Mean and standard deviation of at least four biological repeats are presented. Significant differences estimated using Student *t* test are indicated by **P*<0.05; ***P*<0.01 and ****P*<0.005.

At the labeling date, no visible different phenotype could be observed for mutants compared to wild-type (Fig. III-2A). After 24 hours of labeling, the dry weight of the rosettes used to estimate uptake was measured after drying and only a small significant difference could be detected between the wild-type and the *gln1;3a* line under low N (Fig. III-2B). ^{15}N uptake was analyzed taking into account the dry weight of the plants (Fig. III-2C). No significant differences between the mutants and the wild-type could be observed except for *gln1;1b* whose uptake was higher under high nitrogen.

Yield and yield-related traits were measured at the end of the life cycle. No changes in seed biomass (i.e. yield) could be observed among the genotypes, under both low and high nitrate (Fig. III-3A, F). No differences in flowering stem biomass can be detected neither (Fig. III-3B,G). Rosette biomass showed however differences, under low nitrate only, with an increase of the biomass of *gln1;1a*, *gln1;3a*, *gln1;4b* genotypes (Fig. III-3C,H). However, the weak increases in rosette biomass have no effect on the total biomass of the plants (Fig. III-3D,I). Consequently, harvest index (HI; g of seeds per g of total plant dry weight; Fig. III-3E,J) was unchanged in mutants compared to wild type under both nitrate conditions, except a slight HI decrease in *gln1;1a* under low nitrate. It is interesting to note that, despite the differences of biomass observed under low and high nitrogen (values approximately twice more important under high nitrogen compared to low nitrogen), harvest index is in the same magnitude under both conditions, even slightly greater under low nitrogen.

76

Nitrogen concentration in vegetative tissues is different in mutants compared to wild type with major variations in rosette but no impact in N concentration and content in seeds

The total N concentration (N%) was determined in the different compartments of the plant (Fig. III-4). The concentration of N was measured in seeds, flowering stems and rosettes. In seeds, N% does not vary significantly in mutants compared to wild type, except slightly higher than WT in the *gln1;1a* mutant under low nitrate and in the *gln1;1a* and *gln1;3a* mutants under high nitrate (Fig. III-4A,E). In flowering stem, only few differences compared to the wild-type could be observed under low nitrate only. Lower N concentrations were observed in flowering stems of *gln1;1b*, *gln1;3a* and *gln1;4b* (Fig. III-4B). By contrast with seeds and flowering stems, the N% of mutant rosettes was significantly higher than WT in many lines under low N (Fig. III-4C). All mutants except *gln1;3a* and *gln1;4b* presented higher nitrogen concentrations than WT (Fig. III-4C). Under high nitrate, only *gln1;3b* had higher N% than WT (Fig. III-4G). The Nitrogen Harvest Index (NHI) corresponds to the quantity of N in the seeds compared to the total N within the plant (Fig. III-4D,H). No significant differences between mutants and WT could be detected except a slightly lower NHI under low nitrogen in *gln1;1a* (Fig. III-4D).

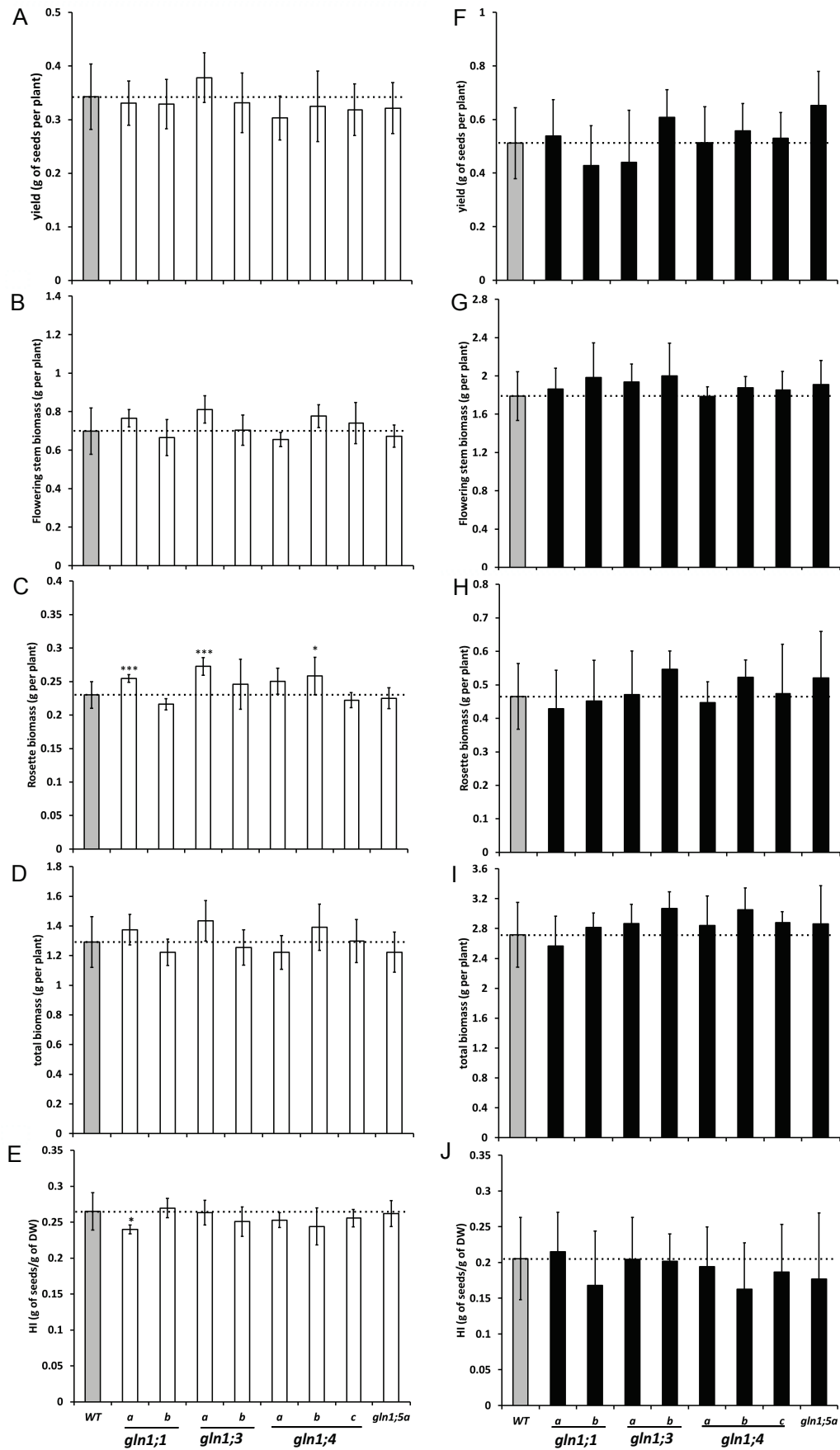


Figure III-3. Yield and biomass of *gln1* knockout mutants and wild-type are not different. Dry weight of seeds (=yield) (A, F), flowering stem (B, G) and rosette (C, H) were measured on plants grown at low N (A-E, white bars) or high N (F-J, black bars). Total biomass (D, I) and harvest index (HI; E, J) were computed. Mean and standard deviation of at least six biological repetitions are presented. Significant differences estimated using Student *t* test are indicated by **P*<0.05, ***P*<0.01 and ****P*<0.005.

¹⁵N remobilization efficiency for grain filling in mutants compared to wild type does not revealed major differences but mutants showed ¹⁵N accumulation in rosette

¹⁵Nitrogen Harvest Index (¹⁵NHI) correspond to the quantity of ¹⁵N in the seeds compared to the total ¹⁵N within the plant, i.e. the partitioning of ¹⁵N in seeds (Fig. III-5A,E). ¹⁵N partitioning in flowering stem (Fig. III-5B,F) and in rosette (Fig. III-5C,G) was also determined. The ratio between ¹⁵NHI and HI normalizes ¹⁵N allocation in seeds to the size of the seed compartment. This ratio was calculated in order to detect small differences that could have been hidden by differences in biomass allocation between WT and mutants and can be considered as an indicator for N remobilization efficiency to the seeds (Fig. III-5D,H).

¹⁵NHI decrease could only be detected in *gln1;1a* mutant under low nitrate (Fig. III-5A). Slight decrease of ¹⁵N partitioning in flowering stem was detected in *gln1;1b* mutant under low N (Fig. III-5B). By contrast, ¹⁵N partitioning in rosettes was significantly higher compared to WT in all the mutant lines under low nitrate except *gln1;3a* and *gln1;5a* (Fig. III-5C). The ¹⁵NHI/HI ratio did not allowed us to detect significant differences of N remobilization efficiency to the seeds between mutants and WT except for *gln1;4b* and *gln1;5a* (Fig. III-5D).

4) Discussion

The aim of this study was to determine the involvement of GLN1 isoforms in biomass production, yield establishment and N resources allocation in Arabidopsis. Knock-out mutants were first analyzed in order to find visual phenotypes for biomass, rosette size, flowering time, senescence or anthocyanin accumulation traits. As no visible phenotype could be identified, the results suggest that *GLN1* genes have no or minor roles in the establishment of these traits. The knock-out mutants were then used for comparison with their wild-type (Col-0 accession) in ¹⁵N labeling experiment as done in Lothier et al (2011) for mutant analysis. The *gln1;2* mutants were not included in this study since analysis of *GLN1;2* gene role in N remobilization from rosettes to seeds has already been performed by Lothier et al (2011). As no significant differences in the partitioning of both dry weight and ¹⁵N could be observed at both vegetative and reproductive stages between wild-type and mutant lines, the authors concluded that the *GLN1;2* gene is not involved in N recycling from leaf to leaf or in N remobilization from rosette to seeds.

¹⁵N uptake was analyzed in order to ensure that the differences potentially highlighted in this study, concerning biomass, yield or N allocation resources, are not linked to a defect in N uptake in mutant genotypes and a role of the mutated *GLN1* in root physiology. No major significant

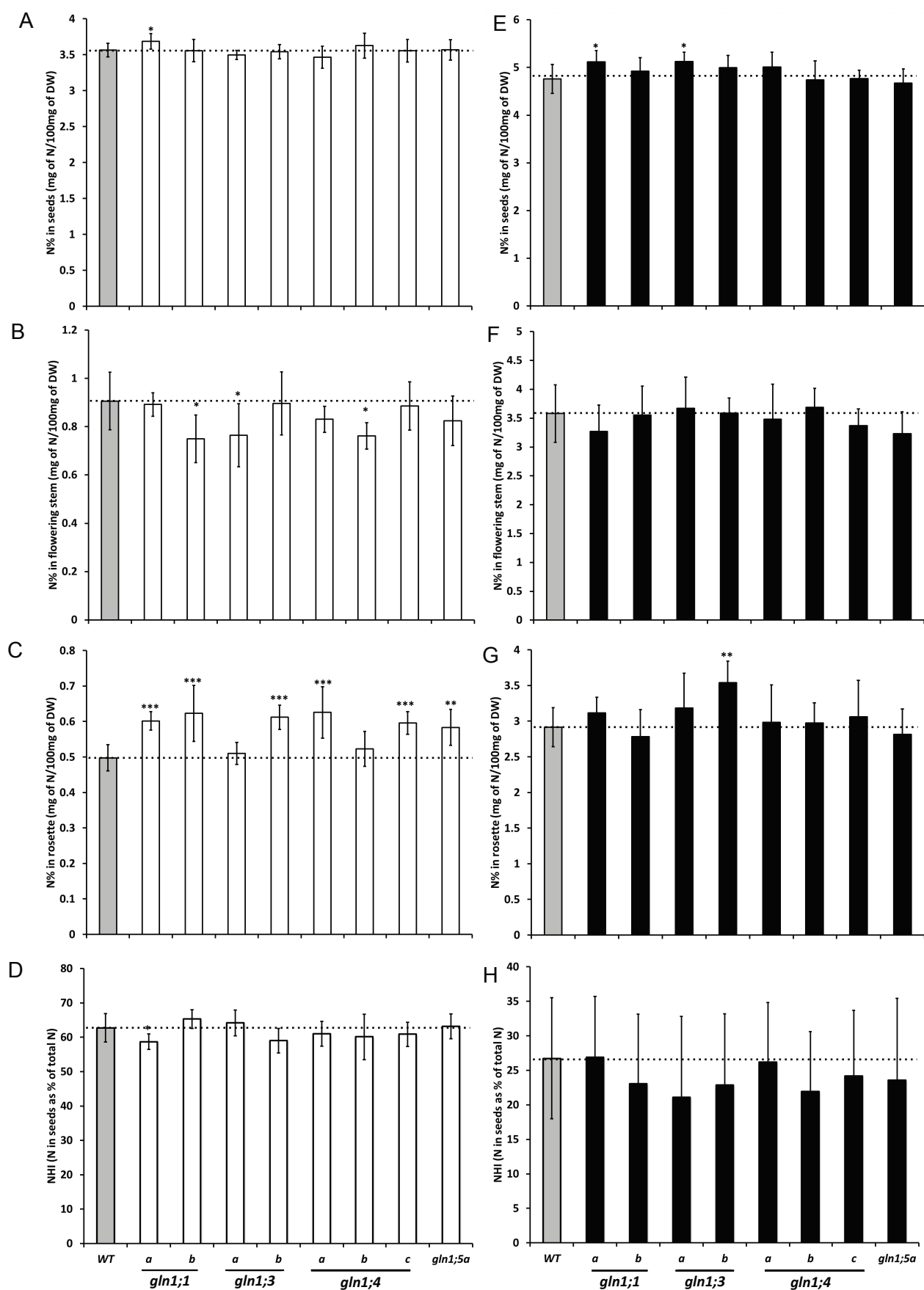


Figure III-4. Determination of wild-type and *gln1* knockout mutants N concentrations in seeds (A, E), flowering stem (B, F) and rosette (C, G). Nitrogen harvest index (NHI; D, H) represents the partition of nitrogen in seeds. Plants were grown at low N (A-D, white bars) or high N (E-H, black bars). Mean and standard deviation of at least six biological repetitions are presented. Significant differences estimated using Student *t* test are indicated by **P*<0.05, ***P*<0.01 and ****P*<0.005.

differences of ^{15}N uptake between the mutants and the wild-type could be observed. It was then concluded that ^{15}N uptake is generally not affected by mutations in *GLN1* genes.

In maize, *gln1-3* and *gln1-4* mutants showed a lower productivity with fewer and smaller grain respectively (Martin et al., 2006). In rice, *Osgs1;1* and *Osgs1;2* mutants both also show a lower productivity (Tabuchi et al., 2005; Funayama et al., 2013). It was then assessed if, in Arabidopsis, mutations in *GLN1* genes also trigger some effects on plant biomass and yield. By contrast with maize and rice, plant biomass and yield are globally not affected by mutations in *GLN1* genes. Few genotypes showed some variations in rosette biomass and HI. However, these variations are not confirmed in all the mutant alleles of a same *GLN1* gene and are only observed under low nitrate conditions. In conclusion, it seems that unlike to maize, individual *GLN1* genes don't have a major role in biomass production and yield establishment in Arabidopsis.

Total N allocation between seeds, flowering stem and rosette was then studied. NHI didn't show differences between wild-type and mutants except for one genotype but this result was not confirmed by the second mutant allele. These results showed that the seed filling with nitrogen is not impaired by mutation in *GLN1* genes. However, determination of N concentration in seeds, flowering stem and rosette allowed us to show that N concentration is significantly higher in the rosette of mutants than in wild type even though not in seeds and flowering stem of wild type and mutants. Higher N concentration in rosettes of mutants could be explained by an increase of N uptake to the rosette or by a decrease in N remobilization from the rosette.

^{15}N resources allocation in seeds, flowering stem and rosette was then used to determine whether uptake or remobilization was the cause of higher N concentration in mutant rosettes. As ^{15}N was used to label plants at vegetative stage at one time point, it can be used to determine N remobilization capacities. While ^{15}N partitioning in seeds and flowering stem was not significantly different between mutants and wild type, ^{15}N partitioning in rosette was significantly different in most of the mutant genotypes relative to wild type when grown under low nitrogen. This result then showed that the increase of nitrogen concentration in rosette is related to a defect in N remobilization from rosette to flowering stem and seeds. Although N remobilization from mutant rosettes appears lower than that from wild-type rosettes, we cannot detect any increase in ^{15}N partitioning in seeds and flowering stems of mutants compared to WT. This is certainly due to the fact that ^{15}N was not allocated to the seeds and flowering stem in a homogenous manner in all the plants of mutants and wild type. Then no significant differences can be detected between mutants and wild type. $^{15}\text{NHI}/\text{HI}$ ratio is an indicator of Nitrogen Remobilization Efficiency to the seeds. We were not able to detect any defects or improvement of this trait in mutants compared to wild type

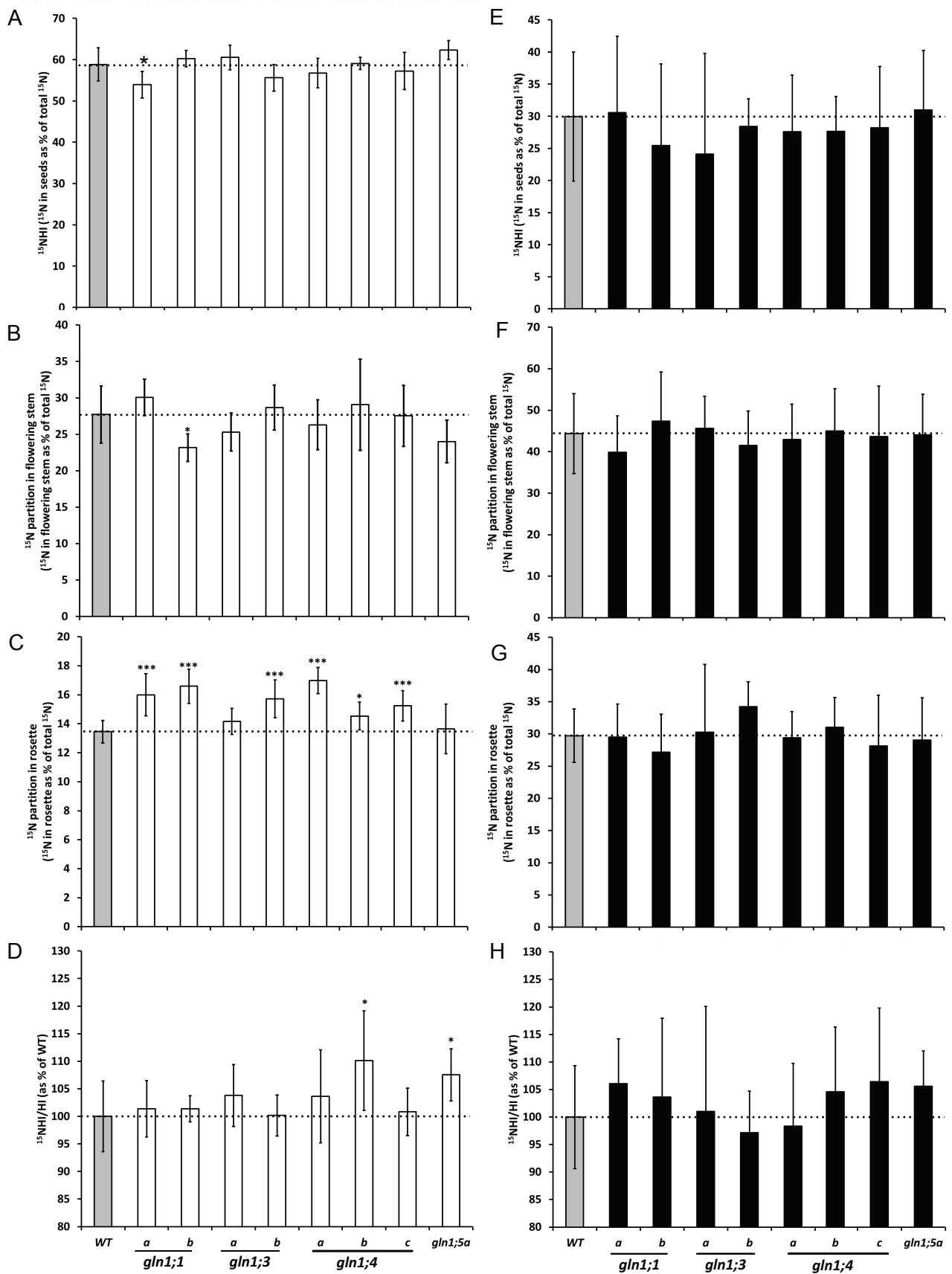


Figure III-5. ^{15}N partitioning (as % of ^{15}N in each organ relative to the total ^{15}N in the plant) in wild-type and *gln1* knockout mutants. Plants were grown under low nitrate (A-D, white bars) or high nitrate (E-H, black bars) until seed maturity. ^{15}N partitioning in seeds (^{15}NHI ; A, E), in flowering stem (B, F) and in rosette (C, G) was determined. $^{15}\text{NHI}/\text{Hi}$ ratio (D, H) was used to monitor nitrogen remobilization to the seeds independently of sink to source sizes. Mean and standard deviation of at least six biological repetitions are presented. Significant differences estimated using Student *t* test are indicated by * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.005$.

since N remobilization process was certainly only impaired from rosettes to reproductive organs (flowering stem + seeds) only. One allele of *gln1;4* mutant and one allele of the *gln1;5* mutant showed however an extra remobilization to the seeds compared to wild-type. However, this result is subject to high variability, low significativity and was not confirmed by the two other mutant alleles in the case of *GLN1;4*, or under high nitrate.

In conclusion, the individual role of the five GLN1 isoforms in N uptake by the roots, in biomass production and yield establishment in Arabidopsis is not significant. However, it seems that they have a significant role on N remobilization from the rosette to the reproductive organs. This role is not specific of one GLN1 isoform and do not have impact on grain filling. As growth conditions can play an important role in plant yield and resources allocation, results obtained in this study need to be confirmed by repeating the experiment on more plants.

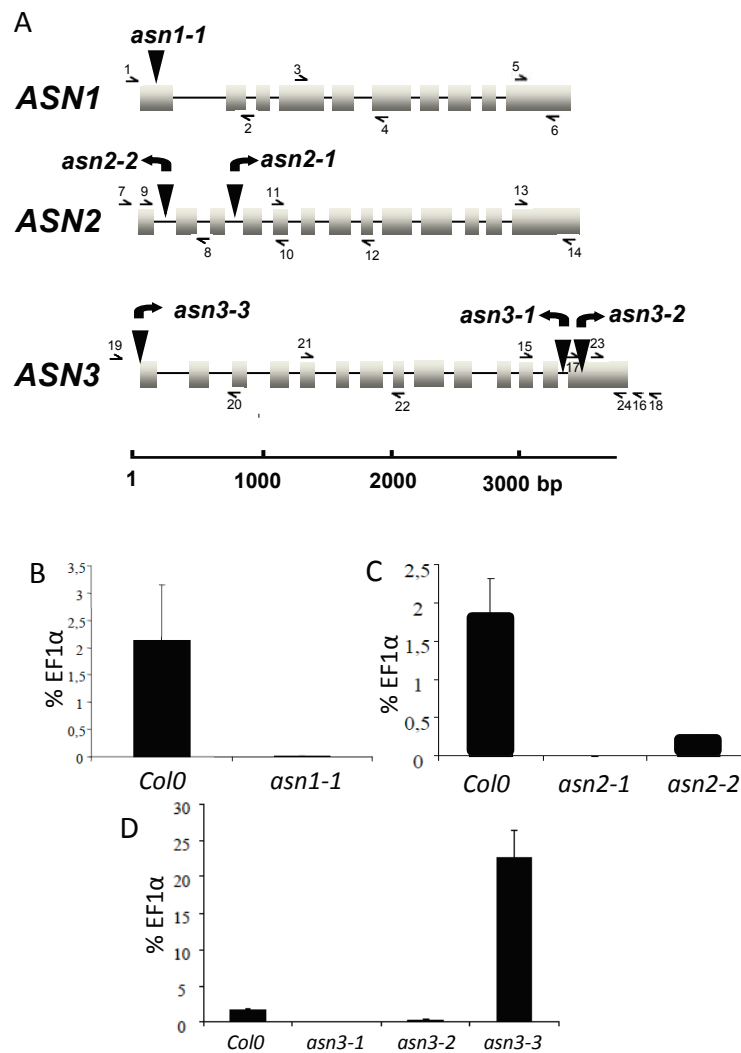


Figure IV-1. Caractérisation des mutants *asn* d'Arabidopsis. (A) Structure des gènes *ASN* d'Arabidopsis. Les positions des insertions T-DNA sont indiquées par un triangle pour chaque lignée mutante. Les amorces utilisées dans cette étude sont représentées par des flèches. L'expression d'*ASN1* (B), d'*ASN2* (C) et d'*ASN3* (D) a été déterminée au sein des lignées mutantes correspondantes.

IV Étude de la famille des asparagine synthétases chez *Arabidopsis thaliana*

1) Introduction

Parmi les acides aminés, l'asparagine est celui présentant le rapport N/C le plus élevé (2/4), ce qui en fait la forme privilégiée de stockage et de transport de l'azote au sein de la plante. Cet acide aminé est synthétisé par l'asparagine synthétase, enzyme codée par une famille multigénique dont les différents gènes sont connus pour être différenciellement régulés par la lumière et les métabolites carbonés et azotés. Ainsi, les différences d'expression et de régulation déjà connues suggèrent des rôles spécifiques pour chacun des gènes notamment pour la synthèse d'asparagine le jour ou la nuit, les processus de remobilisation de l'azote au cours de la sénescence ou lors de la germination des graines. Dans le cadre de mon étude, j'ai plus particulièrement analysé l'expression des trois gènes *ASN* d'*Arabidopsis* en fonction de l'âge des tissus (Figure IV-2), de la disponibilité en azote et de la nature de la source d'azote apportée à la plante (Figure IV-2 et IV-3). Enfin, j'ai réalisé une analyse fonctionnelle des mutants *asn* disponibles (Figure IV-1) afin de déterminer leur biomasse ainsi que leurs capacités d'absorption et de remobilisation de l'azote par marquage ^{15}N (Figures IV-4 à IV-7).

2) Matériels et méthodes

Le matériel utilisé pour l'étude de l'expression des différents gènes *ASN* et le protocole de PCR quantitative sont identiques à ceux décrits dans le chapitre II « Étude de l'expression des gènes *GLN1* chez *Arabidopsis thaliana* » (pages 58 à 70). Les primers utilisés sont listés dans le tableau IV-1.

Les différents mutants utilisés au cours de cette étude pour étudier l'absorption et la remobilisation de l'azote (Tableau IV-2) ont été caractérisés par Laure Gaufichon au cours de sa thèse de doctorat (2009) après obtention auprès du Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC, Nottingham, UK) ou de l'université de Bielefeld (Allemagne) pour la lignée GABI-Kat. Un seul mutant T-DNA, issu de la banque GABI-Kat (Kleinboelting et al., 2012), est disponible pour le gène *ASN1*. Il s'agit de la lignée GK-829B05 qui a été renommé *asn1-1*. Les lignées d'insertion T-DNA SALK_43167 et SALK_146656, issues de la collection du Salk (Alonso et al., 2003), ont été utilisées afin d'étudier le rôle du gène *ASN2* et ont été renommées respectivement *asn2-1* et *asn2-2*. Enfin, les lignées SALK_53490, SALK_74279 et SALK_28188, renommées respectivement *asn3-1*, *asn3-2* et *asn3-3* ont permis l'étude de la fonction du gène *ASN3*. La structure génique des différents gènes *ASN* d'*Arabidopsis* et la position des différentes insertions sont présentées dans la Figure 1A. Gaufichon (2009) a montré que le mutant *asn1-1* est considéré comme un mutant nul car l'expression du gène

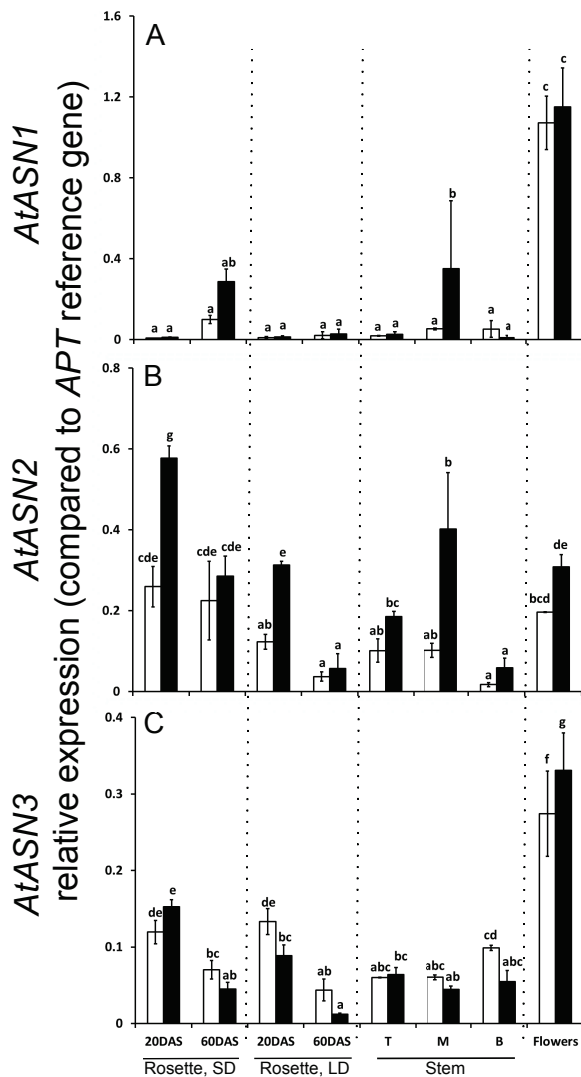


Figure IV-2. Les trois gènes *ASN* d'*Arabidopsis* sont différentiellement exprimés selon les organes, la disponibilité en nitrates et l'âge. L'expression a été analysée dans des rosettes cultivées en jours courts (SD) ou en jours longs (LD), des tiges (haut (T), milieu (M) et bas (B)) et des fleurs. L'âge des tissus augmente de la gauche vers la droite pour les rosettes et la hampe. Le niveau d'expression relatif de chaque gène est donnée par des unités arbitraires (l'expression est comparée à celle du gène de référence *APT*). L'expression relative d'*AtASN1* (A), d'*AtASN2* (B) et d'*AtASN3* (C) est présentée pour des plantes cultivées sous faible (barres blanches) ou fort apport en nitrate (barres noires). NB : Les ordonnées sont différentes pour chaque gène. La moyenne et l'écart type sont représentés et correspondent à, au moins, trois répétitions biologiques. Les différentes lettres indiquent des classes de valeurs significativement différentes à $P < 0,05$. La détermination de ces classes a été réalisée en utilisant le logiciel XLSTAT et la fonction ANOVA, comparaison de Newman-Keuls (SNK).

ASN1 est très fortement réduite chez ce mutant (seulement 3% du niveau d'expression constaté chez le sauvage) (Fig. IV-1B). La mutation *asn2-1* entraîne une suppression totale de l'expression du gène *ASN2* alors que la mutation *asn2-2* provoque une diminution de 84 % de l'expression du gène *ASN2* par rapport au sauvage (Gaufichon et al., 2012). Le mutant *asn2-1* est donc un mutant knock-out alors que le mutant *asn2-2* est un mutant knock-down (Fig. IV-1C). Enfin, cette analyse d'expression a permis de caractériser les mutants *asn3-1* et *asn3-2* comme étant des mutants knock-down alors que le mutant *asn3-3* est un surexprimeur. En effet, les mutations *asn3-1* et *asn3-2* entraînent respectivement une diminution de 90 et 80 % de l'expression du gène *ASN3* alors que la mutation *asn3-3* (se situant dans le premier exon du gène) permet la détection de ce même gène dans une proportion 15 fois plus importante que chez le sauvage (Fig. IV-1D).

Les conditions de culture de l'expérience de marquage ^{15}N et la détermination de l'abondance en ^{15}N ont été décrites dans le chapitre III « Remobilisation de l'azote dans les mutants des glutamine synthétases cytosoliques chez *Arabidopsis thaliana* » (pages 71 à 79).

3) Résultats

3.1) Expression des gènes *ASN* au sein de la plante par qPCR.

Dans le but d'étudier les spécificités d'expression des gènes *ASN* chez *Arabidopsis*, une analyse par RT-PCR quantitative a été entreprise sur différents organes (rosette entière, tige, fleurs) ; selon l'âge des tissus ainsi que selon le niveau de nutrition azotée. Le gène *AtASN1* est plus exprimé sous fort azote et est induit par l'âge dans les rosettes des plantes cultivées en jours courts. Il est également le plus fortement détecté dans les fleurs (Fig. IV-2A). Le gène *AtASN2* est plus exprimé dans les rosettes jeunes que ce soit sous forte et faible nutrition azotée. Il semble aussi plus exprimé dans les hauts de tiges qu'en bas, même si l'expression en milieu de tige semble très forte sous fort azote. L'effet de l'âge sur l'expression d'*ASN2* est en accord avec les données précédemment publiées (Gaufichon et al., 2012). De plus, il semble que ce gène soit plus exprimé sous fort azote (Fig. IV-2B). Le gène *AtASN3* présente un profil d'expression similaire à celui du gène *AtASN2* dans les rosettes. Toutefois aucune différence d'expression en fonction de la disponibilité en azote n'est constatée (Fig. IV-2C). Par ailleurs comme *ASN1*, ce gène est très exprimé dans les fleurs.

L'effet de la source d'azote et la carence en saccharose dans le milieu de culture sur l'expression des gènes *ASN* a été mesuré. Ces expériences ont été réalisées sur des plantules cultivées *in vitro* et âgées de 21 jours dont les parties aériennes et racinaires ont été séparées pour l'analyse. Les différents milieux utilisés sont les suivants : +N, 0% saccharose ; +N, 1% saccharose ; +N, 3% saccharose ; -N, 1% saccharose ; NH_4^+ , 1% saccharose.

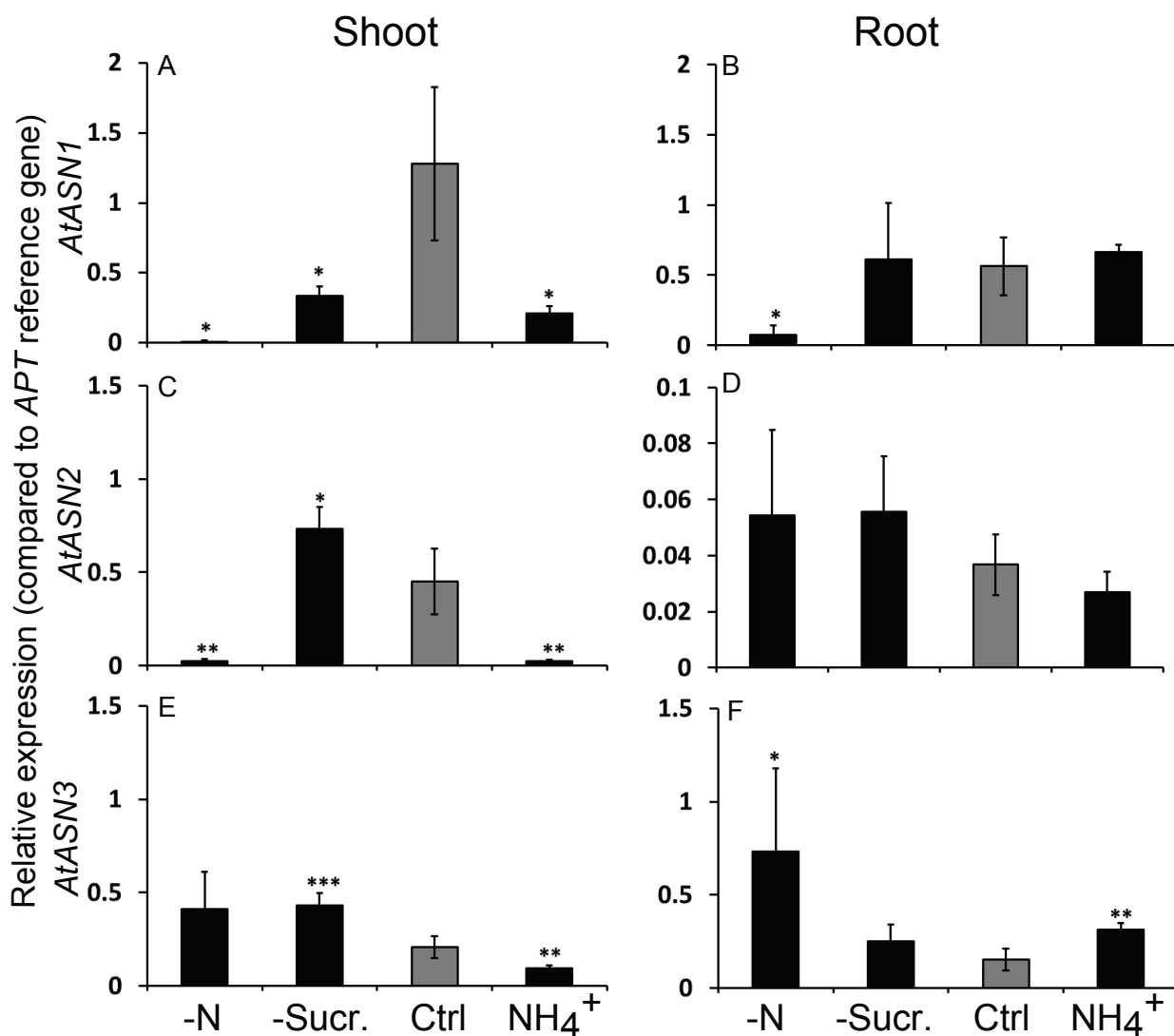


Figure IV-3. Les trois gènes *ASN* d'*Arabidopsis* sont exprimés différemment selon les sources d'azote et de carbone. L'expression des gènes *ASN* a été analysée dans les parties aériennes (panneau de gauche, A, C, E) et les racines (panneau de droite, B, D, F) de plantules d'*Arabidopsis* âgées de 21 jours d'âge et cultivées sur un milieu contrôle (Ctrl; 9 mM de nitrate et 1% (m/v) de saccharose), un milieu déplété en saccharose (-Sucr.; 9 mM de nitrate et pas de saccharose), un milieu déplété en nitrate (-N, pas d'azote et 1% (m/v) de saccharose) ou un milieu dont la source d'azote est l'ammonium (NH_4^+ , 5 mM NH_4^+ et 1% (m/v) de saccharose). La condition contrôle est représentée par des barres grises alors que les traitements sont indiqués par des barres noires. L'expression relative des ARNm a été mesurée par QRT-PCR et est présentée en unités relatives normalisées en fonction de l'expression du gène de référence *APT*. L'expression relative des gènes *AtASN1* (A, B), *AtASN2* (C, D) et *AtASN3* (E, F) est présentée. Pour chaque gène, les échelles sont identiques entre les parties aériennes et les racines à l'exception du gène *AtASN2* dont l'expression est plus faible dans les racines. La moyenne et l'écart type de trois échantillons biologiques, contenant 10 plantes chacun, sont représentés. Les différences significatives ont été estimées par un test *t* de Student et sont indiquées par **P*<0,05, ***P*<0,01 et ****P*<0,005.

AtASN1 est réprimé par la carence en saccharose dans les feuilles d'*Arabidopsis* (Fig. IV-3A) et une induction de *AtASN2* et *AtASN3* dans les racines et les feuilles est observée (Fig. IV-3C-F). La carence en azote inhibe *AtASN1* et *AtASN2* essentiellement dans les parties aériennes (Fig. IV-3A et C) et induit *AtASN3* au niveau des racines essentiellement (Fig. IV-3F). L'apport d'ammonium produit le même effet sur les trois gènes *ASN* qui sont réprimés dans les parties aériennes (Fig. IV-3A, C et E). Dans les racines, l'expression du gène *AtASN3* est induite (Fig. IV-3F).

3.2) Phénotypage des géotypes *asn* mutants par marquage ¹⁵N.

La biomasse, le rendement et l'efficacité d'utilisation de l'azote ont été mesurés et estimés dans les mutants *asn*, comme décrit précédemment dans le chapitre III. La taille des rosettes, la date de floraison, l'apparition des symptômes de sénescence et l'accumulation d'anthocyanes, ont également été observées. Les mutants *asn1-1* et *asn2-1*, tous deux mutants nuls pour *ASN1* et *ASN2* respectivement, présentent un fort phénotype de diminution de croissance au stade végétatif qui perdure jusqu'à la fin du cycle de la plante (Fig. IV-4A,B,D et IV-5). Le mutant *asn2-2* présente également un phénotype de réduction de biomasse, toutefois plus faible que celui des deux mutants *asn1-1* et *asn2-1*. Ce phénotype n'a pas été observé chez les lignées mutantes pour le gène *ASN3*, que ce soit chez les lignées présentant une expression réduite ou chez la lignée surexprimant le gène *ASN3*. Aucun phénotype de la floraison ou de sénescence n'a été observé. Il est clairement visible à l'œil nu que les plantes de géotype *asn1-1*, *asn2-1* et *asn2-2* sont vert pâle par rapport au sauvage, ce qui montre un déficit en chlorophylle. Ce phénotype n'est pas observé chez les mutants *asn3*. De plus, l'apparition d'anthocyanes à la suite du passage en jours longs est retardée dans *asn1-1*, *asn2-1* et *asn2-2* par rapport au sauvage (résultats non montrés).

Les géotypes *asn1-1*, *asn2-1* et *asn2-2* montrent une réduction de biomasse indépendante de la disponibilité en azote. L'absorption de ¹⁵N a été analysée en prenant en compte la biomasse des plantes (Fig. IV-4C,E). Dans ce cas, aucune différence dans les capacités d'absorption des différents géotypes n'est observée sous fort azote (Fig. IV-4E), et seul les mutants *asn2-1* présentent une diminution significative d'absorption de ¹⁵N sous faible azote bien que les mutants *asn1-1* semblent présenter la même tendance (Fig. IV-4C). L'étude de la biomasse des différents compartiments de la plante, récoltés en fin de cycle de culture, montre que le rendement (poids du compartiment graines) ne varie pas, que ce soit sous faible et fort azote (Fig. IV-5A,F) sauf pour le sur-expresser *asn3-3* dont le poids total des graines diminue sous fort azote (Fig. IV-5F). Par contre, des variations de biomasse peuvent être observées pour les autres compartiments. La biomasse de la hampe florale est statistiquement réduite dans *asn1-1* par rapport au sauvage sous faible et fort azote. C'est aussi

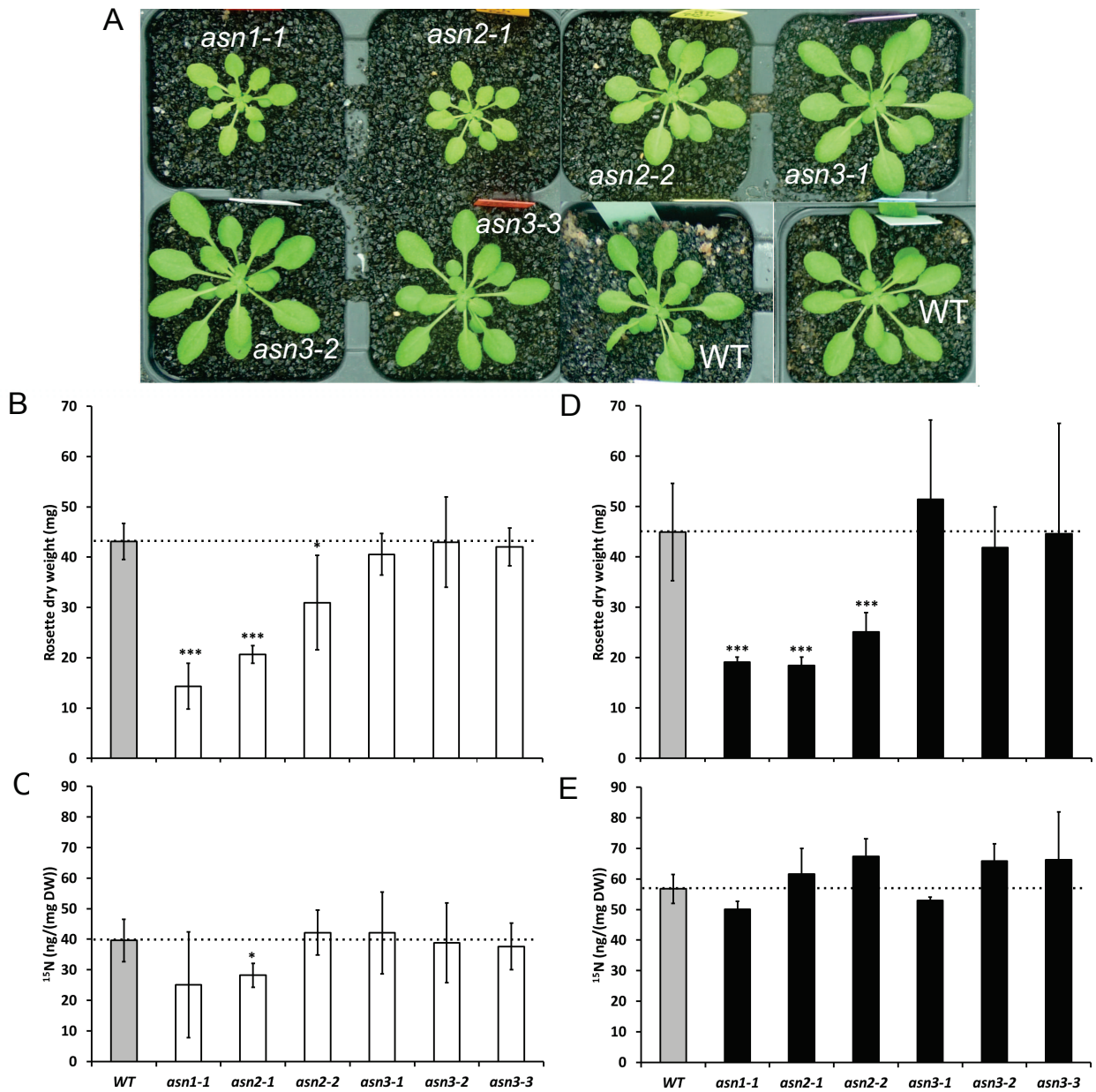


Figure IV-4. Nitrogen uptake and plant biomass of *asn* mutants show differences from wild type 42 days after sowing. (A) Phenotype of plants grown under low N are shown. (B, D) Dry weight of rosettes after 24h of ¹⁵N labeling (43 DAS). (C, E) ¹⁵N uptake in the *asn* mutants and wild-type is measured as ng ¹⁵N per mg DW. Plants were grown under low N (white bars; B, C) and high N (black bars; D, E) conditions. Mean and standard deviation of, at least, three biological repeats are presented. Significant differences estimated using Student *t* test are indicated by **P*<0.05; ***P*<0.01 and ****P*<0.005.

le cas dans *asn2-1* mais uniquement sous fort azote (Fig. IV-5C,H). Les différences les plus fortes se retrouvent en fin de cycle, comme au stade végétatif, pour le compartiment rosette. Les rosettes des mutants *asn1-1*, *asn2-1* et *asn2-2* ont une biomasse réduite sous faible et fort azote (Fig. IV-5B,G). Le cumul de ces défaut de croissance résulte en une diminution de biomasse significative pour *asn1-1* sous fort et faible azote (Fig. IV-5D,I) et pour *asn2-1* mais uniquement significative sous fort azote. Sous faible azote, *asn2-1* et *asn2-2* semblent également présenter une réduction de leur biomasse par rapport au sauvage toutefois pas statistiquement significative (Fig. IV-5D,I). L'indice de récolte (HI pour Harvest Index) est peu différent sous faible azote entre mutants et sauvage avec toutefois une tendance à être plus élevé dans *asn1-1* et *asn2-1* spécialement sous fort azote (Fig. IV-5E,J). Une diminution significative dans *asn3-2* est mesurée sous faible azote (Fig. IV-5E,J). Le fait remarquable est que malgré leurs plus faibles biomasses foliaires, les mutants *asn1-1* et *asn2-2* produisent un rendement tout à fait correct.

La concentration en azote total (N%) dans les graines et la hampe florale des mutants ne varie pas significativement par rapport au sauvage, à l'exception d'une faible diminution chez le mutant *asn2-1* sous fort azote (Fig. IV-6A,E et IV-6B,F). A l'inverse, sous faible azote, la concentration en azote des rosettes est significativement plus élevée chez la plupart des lignées mutantes, à l'exception de *asn1-1* (Fig.6C). La lignée *asn1-1* présente toutefois une augmentation du N% dans la rosette sous fort azote, de même que *asn2-1* (Fig. IV-6G). Malgré ces variations, l'indice de récolte azoté (partition d'azote dans les graines, NHI), n'est affecté dans aucune des lignées et sous aucune des conditions de culture (Fig. IV-6D,H).

Le calcul des partitions en ^{15}N dans les graines (^{15}NHI ; Fig. IV-7A,E) et les hampes (Fig. IV-7B,F) n'ont mis en évidence aucune différence majeure entre mutants et sauvage si ce n'est pour *asn2-1* dans les hampes sous fort azote et dans les graines pour *asn3-3* sous fort azote (Fig. IV-7E,F). La partition de ^{15}N dans la rosette (Fig. IV-5C, G) varie chez la plupart des lignées mutantes par rapport au sauvage, de façon contrastée, sous faible azote. En effet, elle diminue pour *asn1-1* et augmente de façon très significative pour *asn2-2*, *asn3-1*, *asn3-2* et *asn3-3*. L'indicateur $^{15}\text{NHI}/\text{HI}$ (Fig. IV-7D,H) n'a pas permis de mettre en évidence de différences significatives de remobilisation de l'azote vers les graines entre les génotypes mutants et le sauvage à l'exception d'une diminution de la remobilisation du ^{15}N chez les mutants *asn1-1* et *asn2-1*, sous faible et fort azote respectivement. Il apparaît donc que les effets des mutations *asn* sur la remobilisation de l'azote sont relativement faibles ce qui ne permet que d'observer des tendances et peu de différences significatives.

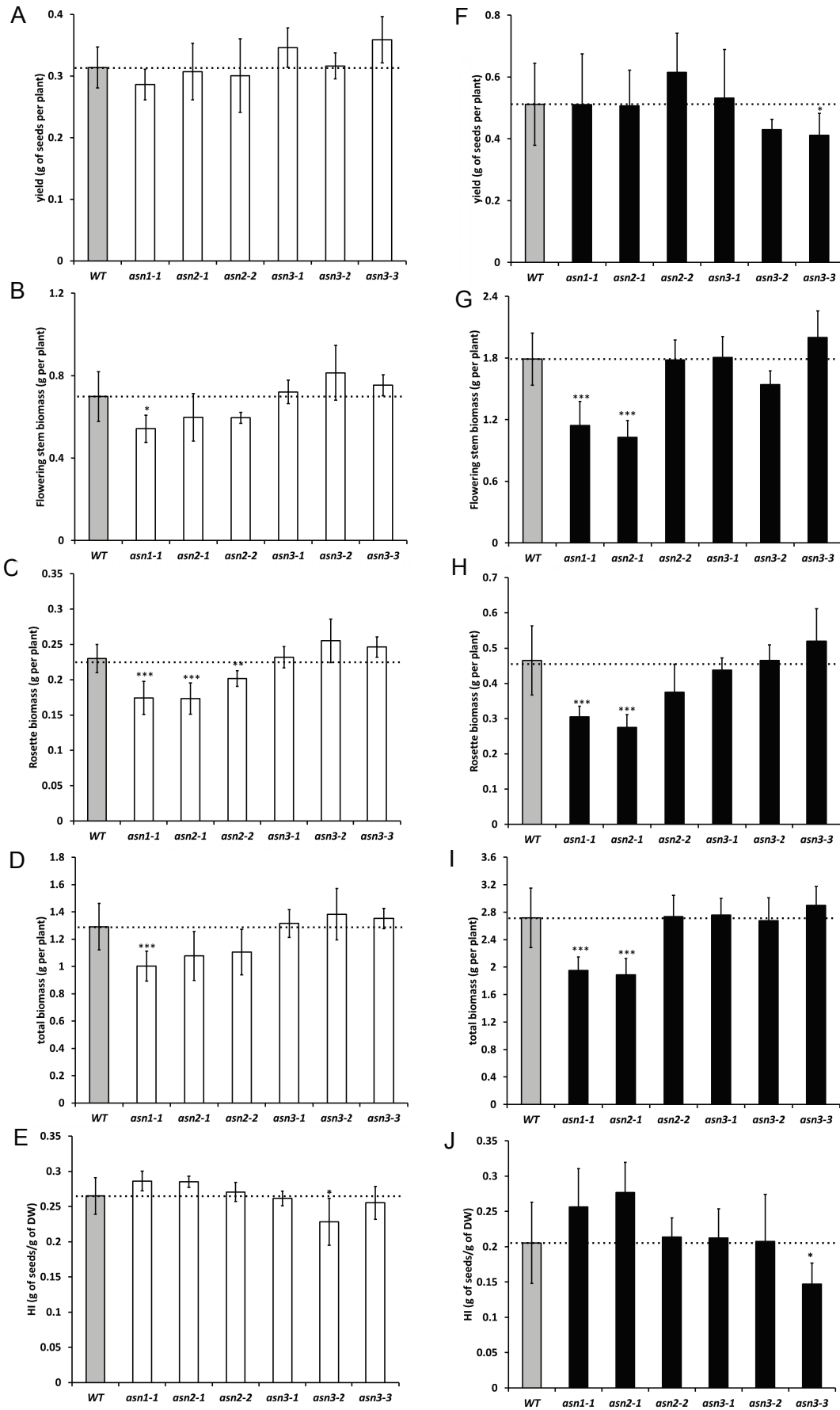


Figure IV-5. Yield and biomass of wild-type and *asn* knockout mutants. Dry weight of seeds (=yield) (A, F), flowering stem (B, G) and rosette (C, H) were measured on plants grown at low N (A-E, white bars) or high N (F-J, black bars). Total biomass (D, I) and harvest index (HI; E, J) were computed. Mean and standard deviation of at least six biological repetitions are presented. Significant differences estimated using Student *t* test are indicated by **P*<0.05, ***P*<0.01 and ****P*<0.005.

4) Discussion

A la différence des résultats observés pour les gènes *GLN1*, il semble que l'expression des gènes *ASN* est moins dépendante de la quantité d'azote dans le milieu. En effet, les gènes *ASN1* et *ASN3* ne semblent pas être sensibles aux conditions de nutrition azotée. La condition de fort azote semble provoquer une expression un peu plus importante du gène *ASN2*, et potentiellement une capacité d'assimilation de l'ammonium plus importante notamment au sein des feuilles au stade végétatif (Gaufichon et al., 2012).

La réponse au nitrate, à la disponibilité en sucres et à l'ammonium a également été testée sur des plantules *in vitro*. La carence en nitrate réprime l'expression d'*ASN1* dans les parties aériennes et les racines, celle d'*ASN2* uniquement dans les parties aériennes. Ces résultats sont cohérents avec un rôle de ces deux gènes dans l'assimilation d'ammonium, leur expression devenant inutile en absence d'azote. A l'inverse, l'induction de l'expression d'*ASN3* dans les racines pourrait indiquer un rôle dans l'assimilation des traces d'ammonium au niveau racinaire. L'ammonium réprime l'expression des trois gènes *ASN* dans les parties aériennes mais provoque l'induction d'*ASN3* dans les racines. *ASN3* aurait donc un rôle dans les racines afin de métaboliser l'ammonium prélevé dans le milieu et ainsi contourner sa toxicité. La carence en sucre réprime l'expression d'*ASN1* et induit celles d'*ASN2* et d'*ASN3*. Ce résultat est surprenant et en contradiction avec la réponse à la lumière décrite par Lam et al (1998) qui avait montré que la lumière réprime l'expression du gène *ASN1* mais induit celle du gène *ASN2*. Cependant, Gaufichon et al (2012) avait déjà rapporté des résultats contradictoires mettant en lumière le fait que la régulation de l'expression des gènes *ASN* est un processus complexe dépendant de plusieurs facteurs comme la disponibilité en lumière, substrats carbonés et azotés.

84

L'expression du gène *ASN1* est faible dans la rosette mais elle augmente avec l'âge en accord avec le statut de gène associé à la sénescence décrit par Guo et al. (2004) et avec le rôle supposé de ce gène dans la remobilisation de l'azote (Gaufichon, 2009 ; (Masclaux-Daubresse et al., 2010)). A l'inverse, l'expression des gènes *ASN2* et *ASN3* diminue avec l'âge suggérant un rôle prépondérant de ces gènes à des stades de développement différents d'*ASN1*.

Les gènes *ASN1* et *ASN3* sont majoritairement exprimés dans les fleurs suggérant un rôle dans le développement des organes reproducteurs, des graines et par la suite dans le remplissage des graines

En conclusion, cette analyse de l'expression des gènes *ASN* chez *Arabidopsis* a permis de confirmer des spécificités d'expression, notamment au niveau tissulaire ou en fonction de l'âge. Comme supposé au préalable, il semble donc que les gènes de cette famille multigénique aient des

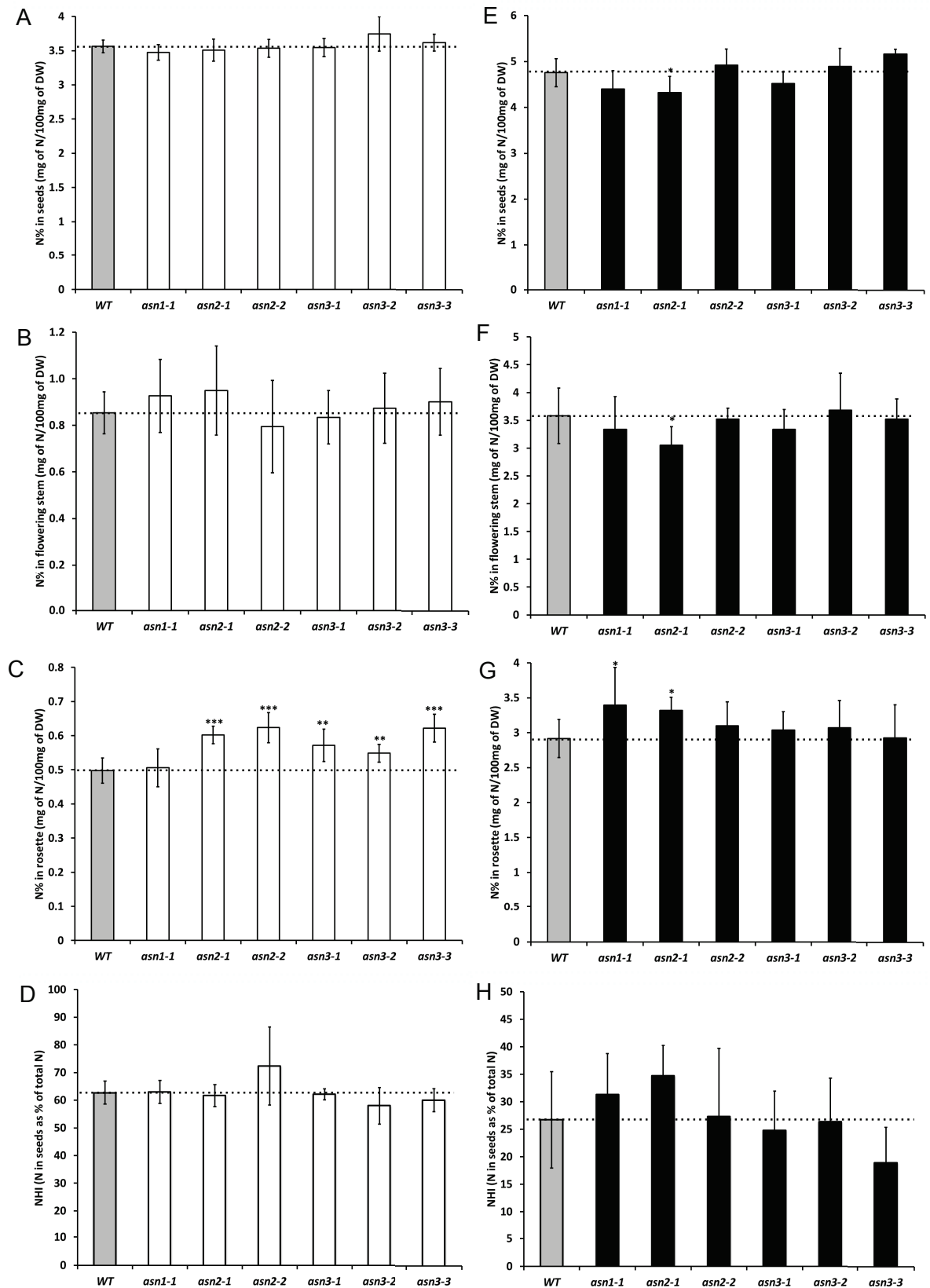


Figure IV-6. Determination of wild-type and *asn* knockout mutants N concentrations in seeds (A, E), flowering stem (B, F) and rosette (C, G). Nitrogen harvest index (NHI; D, H) represents the partition of nitrogen in seeds. Plants were grown at low N (A-D, white bars) or high N (E-H, black bars). Mean and standard deviation of at least six biological repetitions are presented. Significant differences estimated using Student *t* test are indicated by * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.005$.

rôles non redondants dans le métabolisme azoté de la plante afin de faire face à la diversité des conditions environnementales que celle-ci peut rencontrer. Dans le but d'identifier de potentiels rôles pour chacun des gènes *ASN*, différents mutants ont été obtenus et, par la suite, phénotypés.

Le but de ce phénotypage était de déterminer l'implication des isoformes *ASN* dans la production de biomasse, dans le rendement et dans l'allocation des ressources azotées chez *Arabidopsis*. Les mutants ont, tout d'abord, été analysés afin de trouver des phénotypes visuels concernant la biomasse, la taille de la rosette, la date de floraison, la sénescence ou encore l'accumulation des anthocyanes. Les mutants nuls des gènes *ASN1* et *ASN2* présentent une réduction de leur biomasse. Cette réduction est plus importante au stade végétatif et semble traduire un rôle important des gènes *ASN1* et *ASN2* dans la production d'asparagine dans les feuilles à ce stade. Ainsi, l'absence des isoformes *AS1* et *AS2* pourrait ralentir le métabolisme de la plante et donc la croissance, notamment par l'augmentation d'ammonium au sein des mutants (Gaufichon et al., 2012). Par la suite, des mécanismes de compensation pourraient permettre l'élimination de l'ammonium excédentaire. Les gènes *GLN2* et *GLN1;2* sont, en effet, induits chez les mutants d'*ASN2* (Gaufichon et al., 2012). La perturbation du métabolisme des acides aminés peut également expliquer le défaut d'apparition des anthocyanes observé chez les mutants des gènes *ASN1* et *ASN2*. Ces deux gènes semblent donc tous deux avoir un rôle dans l'assimilation de l'ammonium. Ces deux gènes présentent une régulation inverse par la lumière (Lam et al., 1998). L'isoforme *AS1* pourrait être responsable de la synthèse d'asparagine pendant la nuit alors que l'isoforme *AS2* pourrait jouer ce rôle dans la journée. De façon surprenante, bien que l'asparagine ne représente pas la proportion la plus importante des acides aminés chez *Arabidopsis* (Potel et al., 2009; Hunt et al., 2010a), le phénotype des mutants est très marqué et démontre l'importance de la production d'asparagine chez *Arabidopsis* pour permettre le bon développement de la plante.

L'absorption du ^{15}N apparaît diminuée dans *asn1-1* et *asn2-1* sous faible azote mais uniquement significativement pour *asn2-1*. L'absence des isoformes *AS1* et *AS2* semble donc affecter l'absorption du ^{15}N , au moins lorsque l'azote est limitant. *HI* et *NHI* ne présente pas de différences entre le sauvage et les mutants, ce qui démontre que la production de graines et leur remplissage ne sont pas affectés par la dérégulation des gènes *ASN*. Une augmentation significative des concentrations en azote dans les rosettes des mutants *asn* a été mesurée. Cette augmentation est corrélée à l'augmentation de la partition de ^{15}N dans la rosette des mutants sous faible azote. La partition de ^{15}N dans la hampe florale et dans les graines ne présente pas de différences significatives entre les mutants et le sauvage mais des tendances à la baisse semblent toutefois se dessiner chez certains génotypes, traduisant la diminution de la remobilisation à partir de la rosette. De façon surprenante, le génotype *asn1-1* est le seul à présenter une légère diminution de la partition de ^{15}N

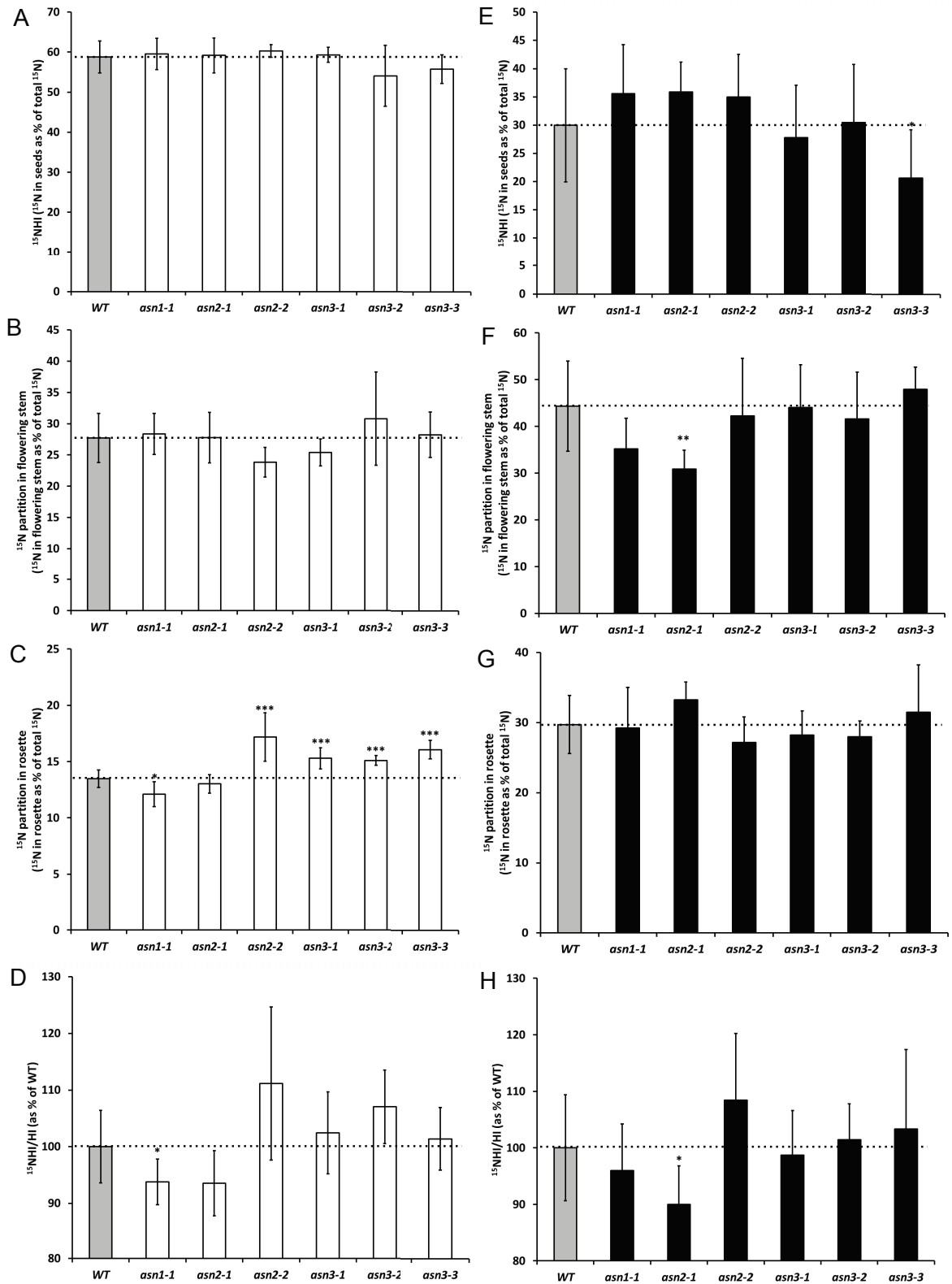


Figure IV-7. ^{15}N partitioning (as % of ^{15}N in each organ relative to the total ^{15}N in the plant) in wild-type and *asn* knockout mutants. Plants were grown under low nitrate (A-D, white bars) or high nitrate (E-H, black bars) until seed maturity. ^{15}N partitioning in seeds (^{15}NHI ; A, E), in flowering stem (B, F) and in rosette (C, G) was determined. $^{15}\text{NHI}/\text{Hi}$ ratio (D, H) was used to monitor nitrogen remobilization to the seeds independently of sink to source sizes. Mean and standard deviation of at least six biological repetitions are presented. Significant differences estimated using Student *t* test are indicated by * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.005$.

dans la rosette alors que la partition de ^{15}N dans la hampe et dans les graines n'est pas différente du sauvage et que le rapport $^{15}\text{NHI}/\text{HI}$ est légèrement plus faible, traduisant un problème dans la remobilisation.

En conclusion, les gènes *ASN1* et *ASN2* ont un impact important sur la production de biomasse et dans une moindre mesure sur l'absorption d'azote par les racines. Cependant, le rendement n'est pas affecté chez les mutants de ces gènes. La dérégulation du gène *ASN3*, notamment sa surexpression (génotype *asn3-3*), provoque, quant à elle, une diminution du rendement mais uniquement sous fort azote.

Notre étude a permis d'observer des différences significatives et des tendances, entre sauvage et mutants qui traduisent un impact des gènes *asn* sur le processus d'absorption de l'azote et de remobilisation de l'azote de la rosette vers les graines. Toutefois, ces résultats devront être confirmés lors d'une répétition de l'expérience qui comprendra un plus grand nombre de plantes dans la mesure où les conditions de culture peuvent avoir un impact important sur le rendement des plantes et l'allocation de leurs ressources.

Tableau IV-1 : Liste des amorces utilisées au cours de cette étude

Nom	Gène	Séquence (5' → 3')	Utilisation
APT Q2+	APT (At1g27450)	CGGGGATTTTAAGTGAACA	qPCR (gène de référence)
APT Q2-	APT (At1g27450)	GAGACATTTTTCGTGGGATT	qPCR (gène de référence)
1	ASN1 (At3g47340)	TTTGTTCCCATACACGACTCC	Génotypage lignée <i>asn1-1</i>
2	ASN1 (At3g47340)	TCCATGGATATAGCGTTACCG	Génotypage lignée <i>asn1-1</i>
3	ASN1 (At3g47340)	ATGACTGTGAGCATTTTCGAAACG	Vérification expression
4	ASN1 (At3g47340)	CTTTCCTGCCTTCAAGTCCGGT	Vérification expression
5	ASN1 (At3g47340)	GTGGCTTGTTGACTGCAAAG	qPCR
6	ASN1 (At3g47340)	TCACAACTCCTTGACCCATCA	qPCR
7	ASN2 (At5g65010)	AGTGGAAATGAAAAGCAGAATG	Génotypage lignée <i>asn2-2</i>
8	ASN2 (At5g65010)	TTCAGATGACCAGCAAGGAAC	Génotypage lignée <i>asn2-2</i>
9	ASN2 (At5g65010)	CGTATCATCGAACTCTCTCGC	Génotypage lignée <i>asn2-1</i>
10	ASN2 (At5g65010)	TTGAGTAGATGTGGCCAGGAG	Génotypage lignée <i>asn2-1</i>
11	ASN2 (At5g65010)	GATTGTGAACAGTTTATGTCTTTTCT	Vérification expression
12	ASN2 (At5g65010)	AGCAACTTCTTGCCAGCTTTAAGA	Vérification expression
13	ASN2 (At5g65010)	CGACTGTACCAGGAGGTCCAA	qPCR
14	ASN2 (At5g65010)	GTTCCATTCTAGGAAGAGGATCT	qPCR
15	ASN3 (At5g10240)	TGATGGAGTTGGATACAGCTG	Génotypage lignée <i>asn3-1</i>
16	ASN3 (At5g10240)	TTGCATGAACCAACCTAAACC	Génotypage lignée <i>asn3-1</i>
17	ASN3 (At5g10240)	GCAGAGTGCTGCTAGAGCAAC	Génotypage lignée <i>asn3-2</i>
18	ASN3 (At5g10240)	GGCAACCAAATACTGATTATCG	Génotypage lignée <i>asn3-2</i>
19	ASN3 (At5g10240)	TGATGGAACATCATTAGTGATGG	Génotypage lignée <i>asn3-3</i>
20	ASN3 (At5g10240)	CTCCATTGACCTGAAAGCAAG	Génotypage lignée <i>asn3-3</i>
21	ASN3 (At5g10240)	ATGATTGTGAGCAGTTTATGTGC	Vérification expression
22	ASN3 (At5g10240)	CTGCCAGCTTTAAGATCCGGG	Vérification expression
23	ASN3 (At5g10240)	GGTCCAAGTGTGGCATGTAGC	qPCR
24	ASN3 (At5g10240)	AATGGCTGGAGTCTTCTCTGC	qPCR

Tableau IV-2 : lignées mutantes utilisées, provenance et niveau d'expression associé.

Nom du mutant	Nom de la lignée	Collection de mutants	Gène (numéro AGI)	Niveau d'expression
<i>asn1-1</i>	GK-829B05	GABI-Kat	ASN1 (At3g47340)	Knock-out
<i>asn2-1</i>	SALK_43167	Salk	ASN2 (At5g65010)	Knock-out
<i>asn2-2</i>	SALK_146656	Salk		Knock-down
<i>asn3-1</i>	SALK_53490	Salk	ASN3 (At5g10240)	Knock-down
<i>asn3-2</i>	SALK_74279	Salk		Knock-down
<i>asn3-3</i>	SALK_28188	Salk		surexprimeur

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Chez le colza, l'amélioration des capacités de recyclage et de remobilisation de l'azote à partir des feuilles sénescentes constitue un objectif important afin de limiter la perte d'azote qui a lieu à l'occasion de la chute des feuilles au stade végétatif. Les gènes codant les glutamine synthétases cytosoliques (famille multigénique *GLN1*) et les asparagine synthétases (famille multigénique *ASN*) sont de bons gènes candidats dans la remobilisation de l'azote lors de la sénescence. En effet, ces deux familles multigéniques permettent respectivement la synthèse de la glutamine et de l'asparagine, deux acides aminés qui sont des formes privilégiées de transport de l'azote dans le phloème. Comme plusieurs gènes *GLN1* sont associés à la sénescence foliaire chez *Arabidopsis* et le colza (Buchanan-Wollaston and Ainsworth, 1997; Guo et al., 2004), leur implication dans le processus de remobilisation de l'azote est proposée. Les études menées sur le maïs et le riz montrent en effet que les GS1 ont un rôle significatif sur l'obtention du rendement et sur la production de biomasse (Tabuchi et al., 2005; Martin et al., 2006; Funayama et al., 2013). L'induction des gènes *ASN* au cours de la sénescence foliaire a également été constatée chez *Arabidopsis* et le tournesol, et leur rôle dans la remobilisation également évoqué (Guo et al., 2004; Herrera-Rodriguez et al., 2006).

L'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier le rôle des deux familles multigéniques, glutamine synthétases cytosoliques et asparagine synthétases chez le colza et *Arabidopsis thaliana*, qui appartient à la même famille des Brassicacées. J'ai donc étudié l'expression des gènes *GLN1* chez *Arabidopsis* et le colza afin de comparer les profils d'expression des gènes homologues dans ces deux modèles en fonction de l'âge foliaire et en réponse à la disponibilité en azote. J'ai également étudié l'expression des gènes *ASN* d'*Arabidopsis* mais n'ai pas eu le temps de réaliser cette étude chez le colza. Enfin, j'ai analysé la contribution des gènes *GLN1* et *ASN* dans le processus de remobilisation de l'azote des feuilles vers les graines en formation en utilisant des mutants d'*Arabidopsis* et un marquage à l'azote 15 qui a permis le suivi des flux d'azote au sein des plantes.

Grâce à une collaboration avec Boulos Chaloub, directeur de recherche à l'INRA d'Évry et Jérémy Just, post-doctorant dans son équipe, j'ai identifié 16 gènes *GLN1* de colza, déduit leurs structures et estimé les relations phylogénétiques avec les homologues d'*Arabidopsis*. Les seize gènes se répartissent en cinq groupes d'homéologie avec, au sein de chaque groupe, l'un des cinq gènes *GLN1* d'*Arabidopsis* et les gènes des génomes parentaux (*B. rapa* et *B. oleracea*). L'analyse de leurs expressions au stade végétatif dans différents organes (feuilles, collet, pivot), en fonction de la disponibilité en azote et en fonction de l'âge des feuilles a permis une comparaison avec l'expression des gènes homologues d'*Arabidopsis*. Mathilde Orsel (Chargée de recherches INRA), qui avait étudié précédemment la famille des glutamine synthétase cytosoliques chez le colza à partir de données d'EST, a apporté des données de séquençage et d'expression sur des colzas cultivés au champ ce qui nous a permis de faire une publication dans *Journal of Experimental Botany* (chapitre I des résultats).

Grâce à la mesure de l'expression des cinq gènes *GLN1* d'Arabidopsis, j'ai pu dresser un modèle des profils d'expression de différents gènes *GLN1* dans les plantules, au stade végétatif et au stade reproducteur et émettre des hypothèses quant à leurs fonctions. Les résultats obtenus ont permis la rédaction d'une publication à soumettre constituant le chapitre II des Résultats.

De plus, grâce à l'étude de l'expression des gènes *GLN1* chez le colza et chez Arabidopsis, j'ai pu comparer les profils d'expression des gènes homologues. La réponse des gènes homologues à la disponibilité en azote, à l'âge ou à la nature de l'organe considéré est globalement homogène au sein d'un même groupe d'homéologie. Ceci suggère qu'il y a eu conservation des fonctions métaboliques entre le colza et Arabidopsis, même si pour être totalement convaincante cette hypothèse nécessite de vérifier que la localisation tissulaire est conservée également. Il semble donc que le transfert de connaissances est possible entre les deux espèces. Pour approfondir cette comparaison, il sera intéressant d'étendre l'étude de l'expression des *GLN1* chez Arabidopsis et le colza à d'autres conditions de culture, et par exemple aux conditions de stress susceptibles de moduler leurs expressions. Lors de son stage, Camille Soulard a pu mettre en évidence une réponse des *GLN1* d'Arabidopsis aux stress pathogène et salin (voir rapport en annexe). Une étude similaire chez le colza serait envisageable. L'existence de plusieurs gènes *GLN1*, notamment chez le colza, pourrait permettre une meilleure adaptation de la plante à l'environnement et à ses changements.

Grâce aux fusions transcriptionnelles disponibles, l'analyse de l'expression des gènes *GLN1* a pu être approfondie chez Arabidopsis aux niveaux tissulaire et cellulaire. L'utilisation de sondes en hybridation *in situ* a permis de confirmer que les *GLN1* sont majoritairement exprimés dans les veines et en particulier au niveau des cellules compagnes du phloème. Ainsi, les gènes *AtGLN1;1* et *AtGLN1;4* s'expriment essentiellement dans les veines mineures alors que les gènes *AtGLN1;3* et *AtGLN1;5* s'expriment dans les veines majeures, tandis que le gène *AtGLN1;2* s'exprime à la fois dans le mésophylle et dans les veines mineures. La redondance d'expression dans les différents vaisseaux explique sans doute que nous n'ayons pas pu trouver de phénotype très remarquable chez nos simples mutants. L'étude de mutants multiples se révélera sans doute plus intéressante en permettant de réduire l'expression des *GS1* dans les veines mineures secondaires et primaires à la fois.

L'étude du rôle des gènes *GLN1* d'Arabidopsis dans le processus de remobilisation de l'azote n'a pas permis de mettre en évidence un gène majeur. Les différents mutants nuls pour chacun des gènes *GLN1* ont été marqués par l'isotope, lourd mais stable, azote 15 (¹⁵N) au stade végétatif. La distribution de cet élément à la fin du cycle de vie de la plante a permis de constater que l'azote 15 était resté dans les rosettes mutantes en proportion plus large que chez le sauvage (chapitre III de la

partie Résultats). Ainsi, la remobilisation de l'azote à partir de la rosette semble affectée chez les mutants. Ceci est confirmé par une concentration en azote totale supérieure dans les rosettes mutantes par rapport au sauvage. Toutefois, il faut constater que les mutants *gln1* d'*Arabidopsis* ne présentent pas de phénotype aussi marqué que ceux observés chez le maïs ou le riz (Tabuchi et al., 2005; Martin et al., 2006). Cela peut s'expliquer par le chevauchement partiel des profils d'expression des gènes *GLN1* au niveau des veines d'une même feuille permettant le maintien d'une activité GS efficace malgré la mutation d'un des gènes. En effet, Dragičević et al (2014) ont montré une association des isoformes *GLN1;1*, *GLN1;2* et *GLN1;3* au sein d'hétérodimère dans les plantules d'*Arabidopsis* ainsi qu'une compensation des mutations des gènes *GLN1;2* et *GLN1;3* par l'augmentation du gène *GLN1;1*. Il serait donc intéressant d'obtenir et d'étudier le triple mutant *gln1;1/gln1;2/gln1;3* car celui-ci devrait présenter un phénotype fort. Par ailleurs, il est à noter que, chez le maïs, l'isoforme GS2 chloroplastique est peu abondante et joue un rôle plus faible que chez *Arabidopsis*. La GS2 du maïs est exprimée pendant les stades de développement précoces, probablement pour la réassimilation de l'ammonium photorespiratoire dont la production est moins importante que chez *Arabidopsis*, le maïs possédant un métabolisme en C4 (Ueno et al., 2005). Ainsi, les GS1 représentent une part plus importante de l'activité GS totale chez le maïs, la mutation d'un gène *GS1* entraînant un effet plus drastique que chez *Arabidopsis*.

En marge de l'étude des GS1, j'ai étudié l'expression des gènes *ASN* chez *Arabidopsis* dans différents organes et en fonction de la disponibilité en azote. Les 3 gènes *ASN* présentent des profils d'expression différents qui suggèrent des rôles spécifiques dans le métabolisme azoté. Un travail préliminaire ne figurant pas dans ce manuscrit m'a permis d'identifier 7 gènes *ASN* fonctionnels chez *Brassica napus*, formant, de façon similaire aux gènes de la famille *GLN1*, des groupes d'homéologie avec les gènes *ASN* d'*Arabidopsis*. Il va être nécessaire de procéder à un travail de dessins d'amorces permettant l'amplification spécifique de chacun des gènes identifiés. A la suite de tests d'efficacité, celles-ci pourront permettre de déterminer les profils d'expression de gènes *ASN* chez le colza sur le même matériel biologique que celui utilisé pendant cette thèse et ainsi de comparer ces profils avec ceux déterminés chez *Arabidopsis*.

Les mutants *asn* ont été marqués avec de l'azote ¹⁵N de la même manière que les mutants *gln1*. Les résultats obtenus sont présentés dans le chapitre IV des résultats. Il semble que les gènes *ASN1* et *ASN2* jouent un rôle dans l'absorption de l'azote et dans la remobilisation de l'azote vers les graines. La fonction de ces gènes apparaît comme cruciale car leur mutation entraîne une réduction de la biomasse et des teneurs en chlorophylle considérable au stade végétatif. Toutefois, l'impact sur la production de graine et le remplissage du grain est très faible, montrant que les AS ne sont pas essentielles pour la productivité et la qualité du grain chez *Arabidopsis*. Le lien entre la diminution de

synthèse d'asparagine et l'accumulation d'ammonium reste à explorer de même que les liens avec (i) la diminution des teneurs en chlorophylles produisant le phénotype vert pale observé chez les mutants des gènes *ASN1* et *ASN2* et (ii) la diminution des anthocyanes. Une seconde expérience a été réalisée pour la répétition de l'observation du phénotype des mutants *asn1* et *asn2*, ainsi qu'une confirmation du rôle de ces deux gènes dans la remobilisation de l'azote par l'emploi d'autres génotypes (surexprimeurs en fond génétique sauvage et mutants *asn1-1* complémentés par des constructions permettant l'expression du gène muté sous le contrôle du promoteur fort 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur). Les mutants *asn2-1* ont également été complémentés mais cette complémentation a été perdue, probablement du fait de phénomènes d'extinction de gène. A l'avenir, l'utilisation d'un autre promoteur constitutif ayant un niveau d'expression moins fort que le 35S, tel celui du gène Ubiquitine, est envisagée. Le phénotypage par marquage ^{15}N d'un double mutant nul pour les gènes *ASN1* et *ASN2* serait intéressant, car montrerait certainement un effet plus marqué sur la remobilisation de l'azote que celui mesuré sur les simples mutants. Toutefois, l'obtention d'un tel mutant a jusqu'à présent échoué, probablement car l'effet combiné de ces deux mutations perturbe de façon trop importante le métabolisme azoté, aboutissant à la létalité.

A plus long terme, le but est de procéder à une approche translationnelle visant à transposer les connaissances acquises chez *Arabidopsis* afin de créer des lignées transformées de colza présentant une meilleure efficacité d'utilisation de l'azote, et notamment une efficacité de remobilisation améliorée. La mise en évidence de similarité d'expression entre les gènes *GLN1* d'*Arabidopsis* constitue un signe encourageant suggérant des possibilités de transfert de connaissances de la plante modèle vers le colza. L'étude des mutants a montré que les gènes *GLN1* et *ASN* jouent un rôle dans la remobilisation de l'azote de la rosette vers les organes reproducteurs chez *Arabidopsis thaliana*. Les effets des mutations *gln1* sur la remobilisation sont faibles et ne permettent pas de choisir un de ces gènes comme gène candidat, cible des futures approches de transformation. La mutation des gènes *ASN1* et *ASN2* montre des effets plus marqués sur la remobilisation et suggère que la surexpression de ces gènes pourrait améliorer l'efficacité de remobilisation de l'azote chez des lignées de colza transformées. Il conviendra toutefois de tester cette hypothèse au préalable chez *Arabidopsis*. Les conditions de culture des plantes seront un paramètre important à prendre en compte dans les stratégies de manipulation de la NUE. En effet, les expériences réalisées chez *Arabidopsis* ont été faites en conditions contrôlées et sur plantes isolées. Or, les lignées de colza transformées devront présenter une amélioration de la NUE dans des conditions de culture agronomiques, avec un peuplement différent où les plantes sont en compétition pour les nutriments.

Le choix du promoteur qui dirigera l'expression des constructions utilisées sera également important car il sera judicieux de coordonner la production supplémentaire d'asparagine avec la phase de développement au cours de laquelle a lieu la remobilisation ainsi que dans les tissus sources. Dans ce but, l'utilisation du promoteur spécifique de la sénescence ProSAG12 ou celui spécifique de la graine ProNAPIN apparaît comme plus judicieuse que l'utilisation d'un promoteur constitutif.

Enfin, l'incorporation, au sein d'une même plante, de plusieurs constructions distinctes pourrait constituer une stratégie efficace permettant l'amélioration de la NUE. En effet, une augmentation de la quantité d'asparagine dans la plante est inutile si celle-ci n'est pas remobilisée vers les graines. Il peut ainsi être intéressant d'agir également à d'autres niveaux du métabolisme azoté, notamment pour augmenter la disponibilité en substrats de l'asparagine synthétase (ammonium et glutamine). Dans cette optique, la surexpression concomitante d'un gène *GLN1* pourrait être intéressante afin d'augmenter la synthèse de glutamine. De plus, les gènes *AAP1* et *AAP2* qui codent des transporteurs d'acides aminés capables de prendre en charge l'asparagine et donc susceptibles de participer au chargement et au déchargement du phloème, ainsi que l'acquisition de l'asparagine par les organes reproducteurs et les graines, sont de bons candidats (Hirner et al., 1998).

Ce travail de thèse a permis l'obtention des séquences des gènes *GLN1* et *ASN* chez le colza, à partir desquelles il pourra être possible de mener des études de génétique d'association. Ces études auront pour but de corréler des polymorphismes de séquences retrouvés au sein des gènes *GLN1* et *ASN*, chez différentes variétés, avec des caractères agronomiques tels que le rendement, la qualité des graines ou l'indice de récolte de l'azote par exemple. De telles approches ont déjà été réalisées sur le colza concernant le contenu en huile des graines (Zou et al., 2010), le poids et la qualité des graines (Li et al., 2014) ou encore des caractéristiques de rendement (hauteur de la plante et de la première ramification, taille des fleurs et des siliques, nombre de graines par silique et poids d'une graine) (Cai et al., 2014). Cette approche permettrait de déterminer si des gènes *GLN1* ou *ASN* de colza sont associés à des caractères important pour le rendement de cette culture.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abbadi, A., and Leckband, G.** (2011). Rapeseed breeding for oil content, quality, and sustainability. *European Journal of Lipid Science and Technology* **113**, 1198-1206.
- Allender, C.J., and King, G.J.** (2010). Origins of the amphiploid species *Brassica napus* L. investigated by chloroplast and nuclear molecular markers. *BMC Plant Biol* **10**, 54.
- Almassy, R.J., Janson, C.A., Hamlin, R., Xuong, N.H., and Eisenberg, D.** (1986). Novel subunit subunit interactions in the structure of glutamine-synthetase. *Nature* **323**, 304-309.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Lisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., and Ecker, J.R.** (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653-657.
- Amiour, N., Imbaud, S., Clement, G., Agier, N., Zivy, M., Valot, B., Balliau, T., Armengaud, P., Quillere, I., Canas, R., Tercet-Laforgue, T., and Hirel, B.** (2012). The use of metabolomics integrated with transcriptomic and proteomic studies for identifying key steps involved in the control of nitrogen metabolism in crops such as maize. *J Exp Bot* **63**, 5017-5033.
- Auger, B., Marnet, N., Gautier, V., Maia-Grondard, A., Leprince, F., Renard, M., Guyot, S., Nesi, N., and Routaboul, J.M.** (2010). A detailed survey of seed coat flavonoids in developing seeds of *Brassica napus* L. *J Agric Food Chem* **58**, 6246-6256.
- Avila-Ospina, L., Moison, M., Yoshimoto, K., and Masclaux-Daubresse, C.** (2014). Autophagy, plant senescence, and nutrient recycling. *J Exp Bot* **65**, 3799-3811.
- Bernard, S.M., Møller, A.L.B., Dionisio, G., Kichey, T., Jahn, T.P., Dubois, F., Baudo, M., Lopes, M.S., Tercé-Laforgue, T., Foyer, C.H., Parry, M.A.J., Forde, B.G., Araus, J.L., Hirel, B., Schjoerring, J.K., and Habash, D.Z.** (2008a). Gene expression, cellular localisation and function of glutamine synthetase isozymes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Mol Biol* **67**, 89-105.
- Bernard, S.M., Moller, A.L., Dionisio, G., Kichey, T., Jahn, T.P., Dubois, F., Baudo, M., Lopes, M.S., Terce-Laforgue, T., Foyer, C.H., Parry, M.A., Forde, B.G., Araus, J.L., Hirel, B., Schjoerring, J.K., and Habash, D.Z.** (2008b). Gene expression, cellular localisation and function of glutamine synthetase isozymes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Mol Biol* **67**, 89-105.
- Bieker, S., Riester, L., Stahl, M., Franzaring, J., and Zentgraf, U.** (2012). Senescence-specific alteration of hydrogen peroxide levels in *Arabidopsis thaliana* and oilseed rape spring variety *Brassica napus* L. cv. Mozart. *J Integr Plant Biol* **54**, 540-554.
- Brauer, E.K., Rochon, A., Bi, Y.M., Bozzo, G.G., Rothstein, S.J., and Shelp, B.J.** (2011). Reappraisal of nitrogen use efficiency in rice overexpressing glutamine synthetase1. *Physiol Plant* **141**, 361-372.
- Britto, D.T., and Kronzucker, H.J.** (2002). NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review. *J Plant Physiol* **159**, 567-584.
- Brugiere, N., Dubois, F., Limami, A.M., Lelandais, M., Roux, Y., Sangwan, R.S., and Hirel, B.** (1999). Glutamine synthetase in the phloem plays a major role in controlling proline production. *Plant Cell* **11**, 1995-2011.
- Buchanan-Wollaston, V., and Ainsworth, C.** (1997). Leaf senescence in *Brassica napus*: Cloning of senescence related genes by subtractive hybridisation. *Plant Mol Biol* **33**, 821-834.
- Cai, D., Xiao, Y., Yang, W., Ye, W., Wang, B., Younas, M., Wu, J., and Liu, K.** (2014). Association mapping of six yieldrelated traits in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet* **127**, 85-96.
- Cai, H., Zhou, Y., Xiao, J., Li, X., Zhang, Q., and Lian, X.** (2009). Overexpressed glutamine synthetase gene modifies nitrogen metabolism and abiotic stress responses in rice. *Plant Cell Rep* **28**, 527-537.

- Caputo, C., Criado, M.V., Roberts, I.N., Gelso, M.A., and Barneix, A.J.** (2009). Regulation of glutamine synthetase 1 and amino acids transport in the phloem of young wheat plants. *Plant Physiol Biochem* **47**, 335-342.
- Castro-Rodriguez, V., Garcia-Gutierrez, A., Canales, J., Avila, C., Kirby, E.G., and Canovas, F.M.** (2011). The glutamine synthetase gene family in *Populus*. *BMC Plant Biol* **11**.
- Chaffei, C., Pageau, K., Suzuki, A., Gouia, H., Ghorbel, M.H., and Masclaux-Daubresse, C.** (2004). Cadmium toxicity induced changes in nitrogen management in *Lycopersicon esculentum* leading to a metabolic safeguard through an amino acid storage strategy. *Plant and Cell Physiology* **45**, 1681-1693.
- Chalhoub, B., Denoeud, F., Liu, S., Parkin, I.A., Tang, H., Wang, X., Chiquet, J., Belcram, H., Tong, C., Samans, B., Correa, M., Da Silva, C., Just, J., Falentin, C., Koh, C.S., Le Clainche, I., Bernard, M., Bento, P., Noel, B., Labadie, K., Alberti, A., Charles, M., Arnaud, D., Guo, H., Daviaud, C., Alamery, S., Jabbari, K., Zhao, M., Edger, P.P., Chelaifa, H., Tack, D., Lassalle, G., Mestiri, I., Schnell, N., Le Paslier, M.C., Fan, G., Renault, V., Bayer, P.E., Golicz, A.A., Manoli, S., Lee, T.H., Thi, V.H., Chalabi, S., Hu, Q., Fan, C., Tollenaere, R., Lu, Y., Battail, C., Shen, J., Sidebottom, C.H., Canaguier, A., Chauveau, A., Berard, A., Deniot, G., Guan, M., Liu, Z., Sun, F., Lim, Y.P., Lyons, E., Town, C.D., Bancroft, I., Meng, J., Ma, J., Pires, J.C., King, G.J., Brunel, D., Delourme, R., Renard, M., Aury, J.M., Adams, K.L., Batley, J., Snowdon, R.J., Tost, J., Edwards, D., Zhou, Y., Hua, W., Sharpe, A.G., Paterson, A.H., Guan, C., and Wincker, P.** (2014). Plant genetics. Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science* **345**, 950-953.
- Chardon, F., Noel, V., and Masclaux-Daubresse, C.** (2012). Exploring NUE in crops and in *Arabidopsis* ideotypes to improve yield and seed quality. *J Exp Bot* **63**, 3401-3412.
- Charlton, K.M., Corner, A.H., Davey, K., Kramer, J.K.G., Mahadevan, S., and Sauer, F.D.** (1975). Cardiac lesions in rats fed rapeseed oils. *Canadian Journal of Comparative Medicine-Revue Canadienne De Medecine Comparee* **39**, 261-269.
- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **16**, 735-743.
- Coruzzi, G.M.** (2003). Primary N-assimilation into Amino Acids in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Book* **2**, e0010-e0010.
- Coschigano, K.T., Melo-Oliveira, R., Lim, J., and Coruzzi, G.M.** (1998). *Arabidopsis* gls mutants and distinct Fd-GOGAT genes: Implications for photorespiration and primary nitrogen assimilation. *Plant Cell* **10**, 741-752.
- Cren, M., and Hirel, B.** (1999). Glutamine synthetase in higher plants: Regulation of gene and protein expression from the organ to the cell. *Plant and Cell Physiology* **40**, 1187-1193.
- Crismani, W., Girard, C., Froger, N., Pradillo, M., Luis Santos, J., Chelysheva, L., Copenhaver, G.P., Horlow, C., and Mercier, R.** (2012). FANCM Limits Meiotic Crossovers. *Science* **336**, 1588-1590.
- d'Erfurth, I., Jolivet, S., Froger, N., Catrice, O., Novatchkova, M., and Mercier, R.** (2009). Turning Meiosis into Mitosis. *Plos Biology* **7**.
- Diaz, C., Lemaitre, T., Christ, A., Azzopardi, M., Kato, Y., Sato, F., Morot-Gaudry, J.F., Le Dily, F., and Masclaux-Daubresse, C.** (2008). Nitrogen recycling and remobilization are differentially controlled by leaf senescence and development stage in *Arabidopsis* under low nitrogen nutrition. *Plant Physiology* **147**, 1437-1449.
- Dragicevic, M., Todorovic, S., Bogdanovic, M., Filipovic, B., Misic, D., and Simonovic, A.** (2014). Knockout mutants as a tool to identify the subunit composition of *Arabidopsis* glutamine synthetase isoforms. *Plant Physiol Biochem* **79**, 1-9.
- Dubois, F., Brugiere, N., Sangwan, R.S., and Hirel, B.** (1996). Localization of tobacco cytosolic glutamine synthetase enzymes and the corresponding transcripts shows organ- and cell-specific patterns of protein synthesis and gene expression. *Plant Mol Biol* **31**, 803-817.
- Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C.** (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic dna for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* **19**, 1349-1349.

- El-kereamy, A., Bi, Y.-M., Ranathunge, K., Beatty, P.H., Good, A.G., and Rothstein, S.J.** (2012). The Rice R2R3-MYB Transcription Factor OsMYB55 Is Involved in the Tolerance to High Temperature and Modulates Amino Acid Metabolism. *PLoS One* **7**.
- Fait, A., Angelovici, R., Less, H., Ohad, I., Urbanczyk-Wochniak, E., Fernie, A.R., and Galili, G.** (2006). Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiology* **142**, 839-854.
- Feller, U., and Fischer, A.** (1994). Nitrogen-metabolism in senescing leaves. *Critical Reviews in Plant Sciences* **13**, 241-273.
- Filleur, S., Dorbe, M.F., Cerezo, M., Orsel, M., Granier, F., Gojon, A., and Daniel-Vedele, F.** (2001). An Arabidopsis T-DNA mutant affected in *Nrt2* genes is impaired in nitrate uptake. *FEBS Lett* **489**, 220-224.
- Finnemann, J., and Schjoerring, J.K.** (2000). Post-translational regulation of cytosolic glutamine synthetase by reversible phosphorylation and 14-3-3 protein interaction. *Plant Journal* **24**, 171-181.
- Fuentes, S.I., Allen, D.J., Ortiz-Lopez, A., and Hernandez, G.** (2001). Over-expression of cytosolic glutamine synthetase increases photosynthesis and growth at low nitrogen concentrations. *J Exp Bot* **52**, 1071-1081.
- Funayama, K., Kojima, S., Tabuchi-Kobayashi, M., Sawa, Y., Nakayama, Y., Hayakawa, T., and Yamaya, T.** (2013). Cytosolic glutamine synthetase1;2 is responsible for the primary assimilation of ammonium in rice roots. *Plant Cell Physiol* **54**, 934-943.
- Gaufichon, L., Reisdorf-Cren, M., Rothstein, S.J., Chardon, F., and Suzuki, A.** (2010). Biological functions of asparagine synthetase in plants. *Plant Science* **179**, 141-153.
- Gaufichon, L., Masclaux-Daubresse, C., Tcherkez, G., Reisdorf-Cren, M., Sakakibara, Y., Hase, T., Clement, G., Avice, J.C., Grandjean, O., Marmagne, A., Boutet-Mercey, S., Azzopardi, M., Soulay, F., and Suzuki, A.** (2012). Arabidopsis thaliana *ASN2* encoding asparagine synthetase is involved in the control of nitrogen assimilation and export during vegetative growth. *Plant Cell Environ* **36**, 328-342.
- Gazzarrini, S., Lejay, L., Gojon, A., Ninnemann, O., Frommer, W.B., and von Wiren, N.** (1999). Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into arabidopsis roots. *Plant Cell* **11**, 937-947.
- Ghoshroy, S., Binder, M., Tartar, A., and Robertson, D.L.** (2010). Molecular evolution of glutamine synthetase II: Phylogenetic evidence of a non-endosymbiotic gene transfer event early in plant evolution. *BMC Evol Biol* **10**, 198.
- Good, A.G., Shrawat, A.K., and Muench, D.G.** (2004). Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? *Trends Plant Sci* **9**, 597-605.
- Goodall, A.J., Kumar, P., and Tobin, A.K.** (2013). Identification and expression analyses of cytosolic glutamine synthetase genes in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Physiol* **54**, 492-505.
- Guo, Y.** (2013). Towards systems biological understanding of leaf senescence. *Plant Mol Biol* **82**, 519-528.
- Guo, Y., Cai, Z., and Gan, S.** (2004). Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence. *Plant Cell and Environment* **27**, 521-549.
- Gutierrez, R.A., Stokes, T.L., Thum, K., Xu, X., Obertello, M., Katari, M.S., Tanurdzic, M., Dean, A., Nero, D.C., McClung, C.R., and Coruzzi, G.M.** (2008). Systems approach identifies an organic nitrogen-responsive gene network that is regulated by the master clock control gene *CCA1*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 4939-4944.
- Habash, D.Z., Massiah, A.J., Rong, H.L., Wallsgrove, R.M., and Leigh, R.A.** (2001). The role of cytosolic glutamine synthetase in wheat. *Annals of Applied Biology* **138**, 83-89.
- Haritatos, E., Ayre, B.G., and Turgeon, R.** (2000a). Identification of phloem involved in assimilate loading in leaves by the activity of the galactinol synthase promoter. *Plant Physiology* **123**, 929-937.

- Haritatos, E., Medville, R., and Turgeon, R.** (2000b). Minor vein structure and sugar transport in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **211**, 105-111.
- Herrera-Rodriguez, M.B., Maldonado, J.M., and Perez-Vicente, R.** (2004). Light and metabolic regulation of HAS1, HAS1.1 and HAS2, three asparagine synthetase genes in *Helianthus annuus*. *Plant Physiol Biochem* **42**, 511-518.
- Herrera-Rodriguez, M.B., Maldonado, J.M., and Perez-Vicente, R.** (2006). Role of asparagine and asparagine synthetase genes in sunflower (*Helianthus annuus*) germination and natural senescence. *J Plant Physiol* **163**, 1061-1070.
- Herrera-Rodriguez, M.B., Carrasco-Ballesteros, S., Maldonado, J.M., Pineda, M., Aguilar, M., and Perez-Vicente, R.** (2002). Three genes showing distinct regulatory patterns encode the asparagine synthetase of sunflower (*Helianthus annuus*). *New Phytologist* **155**, 33-45.
- Hirel, B., Le Gouis, J., Ney, B., and Gallais, A.** (2007). The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *J Exp Bot* **58**, 2369-2387.
- Hirel, B., Bertin, P., Quillere, I., Bourdoncle, W., Attagnant, C., Dellay, C., Gouy, A., Cadiou, S., Retailliau, C., Falque, M., and Gallais, A.** (2001). Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. *Plant Physiology* **125**, 1258-1270.
- Hirner, B., Fischer, W.N., Rentsch, D., Kwart, M., and Frommer, W.B.** (1998). Developmental control of H⁺/amino acid permease gene expression during seed development of *Arabidopsis*. *Plant Journal* **14**, 535-544.
- Hunt, E., Gattolin, S., Newbury, H.J., Bale, J.S., Tseng, H.-M., Barrett, D.A., and Pritchard, J.** (2010a). A mutation in amino acid permease AAP6 reduces the amino acid content of the *Arabidopsis* sieve elements but leaves aphid herbivores unaffected. *J Exp Bot* **61**, 55-64.
- Hunt, E., Gattolin, S., Newbury, H.J., Bale, J.S., Tseng, H.M., Barrett, D.A., and Pritchard, J.** (2010b). A mutation in amino acid permease AAP6 reduces the amino acid content of the *Arabidopsis* sieve elements but leaves aphid herbivores unaffected. *J Exp Bot* **61**, 55-64.
- Hwang, I.S., An, S.H., and Hwang, B.K.** (2011). Pepper asparagine synthetase 1 (CaAS1) is required for plant nitrogen assimilation and defense responses to microbial pathogens. *Plant J* **67**, 749-762.
- Imlau, A., Truernit, E., and Sauer, N.** (1999). Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *Plant Cell* **11**, 309-322.
- Ishida, M., Hara, M., Fukino, N., Kakizaki, T., and Morimitsu, Y.** (2014). Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables. *Breed Sci* **64**, 48-59.
- Ishiyama, K., Inoue, E., Yamaya, T., and Takahashi, H.** (2006). Gln49 and Ser174 residues play critical roles in determining the catalytic efficiencies of plant glutamine synthetase. *Plant Cell Physiol* **47**, 299-303.
- Ishiyama, K., Inoue, E., Tabuchi, M., Yamaya, T., and Takahashi, H.** (2004a). Biochemical background and compartmentalized functions of cytosolic glutamine synthetase for active ammonium assimilation in rice roots. *Plant and Cell Physiology* **45**, 1640-1647.
- Ishiyama, K., Inoue, E., Watanabe-Takahashi, A., Obara, M., Yamaya, T., and Takahashi, H.** (2004b). Kinetic properties and ammonium-dependent regulation of cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 16598-16605.
- Kamachi, K., Yamaya, T., Hayakawa, T., Mae, T., and Ojima, K.** (1992). Vascular bundle-specific localization of cytosolic glutamine-synthetase in rice leaves. *Plant Physiology* **99**, 1481-1486.
- Kiba, T., Feria-Bourrellier, A.-B., Lafouge, F., Lezhneva, L., Boutet-Mercey, S., Orsel, M., Brehaut, V., Miller, A., Daniel-Vedele, F., Sakakibara, H., and Krapp, A.** (2012). The *Arabidopsis* Nitrate Transporter NRT2.4 Plays a Double Role in Roots and Shoots of Nitrogen-Starved Plants. *Plant Cell* **24**, 245-258.

- Kichey, T., Hirel, B., Heumez, E., Dubois, F., and Le Gouis, J. (2007). In winter wheat (*Triticum aestivum* L.), post-anthesis nitrogen uptake and remobilisation to the grain correlates with agronomic traits and nitrogen physiological markers. *Field Crops Research* **102**, 22-32.
- Kleinboelting, N., Huet, G., Kloetgen, A., Viehoveer, P., and Weisshaar, B. (2012). GABI-Kat SimpleSearch: new features of the *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database. *Nucleic Acids Res* **40**, D1211-1215.
- Krajewski, W.W., Jones, T.A., and Mowbray, S.L. (2005). Structure of *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase in complex with a transition-state mimic provides functional insights. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 10499-10504.
- Krapp, A., Berthome, R., Orsel, M., Mercey-Boutet, S., Yu, A., Castaings, L., Elftieh, S., Major, H., Renou, J.P., and Daniel-Vedele, F. (2011). *Arabidopsis* roots and shoots show distinct temporal adaptation patterns toward nitrogen starvation. *Plant Physiology* **157**, 1255-1282.
- Krapp, A., David, L.C., Chardin, C., Girin, T., Marmagne, A., Leprince, A.S., Chaillou, S., Ferrario-Mery, S., Meyer, C., and Daniel-Vedele, F. (2014). Nitrate transport and signalling in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **65**, 789-798.
- Laine, P., Ourry, A., Macduff, J., Boucaud, J., and Salette, J. (1993). Kinetic-parameters of nitrate uptake by different catch crop species - Effects of low-temperatures or previous nitrate starvation. *Physiol Plant* **88**, 85-92.
- Lam, H.M., Peng, S.S.Y., and Coruzzi, G.M. (1994). Metabolic-regulation of the gene encoding glutamine-dependent asparagine synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **106**, 1347-1357.
- Lam, H.M., Hsieh, M.H., and Coruzzi, G. (1998). Reciprocal regulation of distinct asparagine synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **16**, 345-353.
- Lam, H.M., Wong, P., Chan, H.K., Yam, K.M., Chen, L., Chow, C.M., and Coruzzi, G.M. (2003). Overexpression of the *ASN1* gene enhances nitrogen status in seeds of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **132**, 926-935.
- Lancien, M., Martin, M., Hsieh, M.H., Leustek, T., Goodman, H., and Coruzzi, G.M. (2002). *Arabidopsis* *glt1-T* mutant defines a role of NADH-GOGAT in the non-photorespiratory ammonium assimilatory pathway. *Plant Journal* **29**, 347-358.
- Le Deunff, E., and Malagoli, P. (2014). An updated model for nitrate uptake modelling in plants. I. Functional component: cross-combination of flow-force interpretation of nitrate uptake isotherms, and environmental and in planta regulation of nitrate influx. *Ann Bot* **113**, 991-1005.
- Lea, P.J., Sodek, L., Parry, M.A.J., Shewry, P.R., and Halford, N.G. (2006). Asparagine in plants. *Annals of Applied Biology* **150**, 1-26.
- Lemaitre, T., Gaufichon, L., Boutet-Mercey, S., Christ, A., and Masclaux-Daubresse, C. (2008). Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in *Arabidopsis thaliana* Wassileskija accession. *Plant Cell Physiol* **49**, 1056-1065.
- Leran, S., Varala, K., Boyer, J.-C., Chiurazzi, M., Crawford, N., Daniel-Vedele, F., David, L., Dickstein, R., Fernandez, E., Forde, B., Gassmann, W., Geiger, D., Gojon, A., Gong, J.-M., Halkier, B.A., Harris, J.M., Hedrich, R., Limami, A.M., Rentsch, D., Seo, M., Tsay, Y.-F., Zhang, M., Coruzzi, G., and Lacombe, B. (2014). A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. *Trends Plant Sci* **19**, 5-9.
- Li, F., Chen, B., Xu, K., Wu, J., Song, W., Bancroft, I., Harper, A.L., Trick, M., Liu, S., Gao, G., Wang, N., Yan, G., Qiao, J., Li, J., Li, H., Xiao, X., Zhang, T., and Wu, X. (2014). Genome-Wide Association Study Dissects the Genetic Architecture of Seed Weight and Seed Quality in Rapeseed (*Brassica napus* L.). *DNA Res* **21**, 355-367.
- Li, R.J., Hua, W., and Lu, Y.T. (2006). *Arabidopsis* cytosolic glutamine synthetase *AtGLN1;1* is a potential substrate of *AtCRK3* involved in leaf senescence. *Biochem Biophys Res Commun* **342**, 119-126.
- Liu, K.H., and Tsay, Y.F. (2003). Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter *CHL1* by phosphorylation. *Embo Journal* **22**, 1005-1013.

- Liu, S., Liu, Y., Yang, X., Tong, C., Edwards, D., Parkin, I.A., Zhao, M., Ma, J., Yu, J., Huang, S., Wang, X., Wang, J., Lu, K., Fang, Z., Bancroft, I., Yang, T.J., Hu, Q., Yue, Z., Li, H., Yang, L., Wu, J., Zhou, Q., Wang, W., King, G.J., Pires, J.C., Lu, C., Wu, Z., Sampath, P., Wang, Z., Guo, H., Pan, S., Min, J., Zhang, D., Jin, D., Li, W., Belcram, H., Tu, J., Guan, M., Qi, C., Du, D., Li, J., Jiang, L., Batley, J., Sharpe, A.G., Park, B.S., Ruperao, P., Cheng, F., Waminal, N.E., Huang, Y., Dong, C., Wang, L., Hu, Z., Zhuang, M., Huang, J., Shi, J., Mei, D., Liu, J., Lee, T.H., Jin, H., Li, Z., Li, X., Zhang, J., Xiao, L., Zhou, Y., Liu, Z., Liu, X., Qin, R., Tang, X., Liu, W., Wang, Y., Zhang, Y., Lee, J., Kim, H.H., Denoeud, F., Xu, X., Liang, X., Hua, W., Chalhou, B., and Paterson, A.H. (2014). The Brassica oleracea genome reveals the asymmetrical evolution of polyploid genomes. *Nature communications* **5**, 3930.
- Lohaus, G., and Moellers, C. (2000). Phloem transport of amino acids in two Brassica napus L. genotypes and one B-carinata genotype in relation to their seed protein content. *Planta* **211**, 833-840.
- Lohaus, G., and Schwerdtfeger, M. (2014). Comparison of sugars, iridoid glycosides and amino acids in nectar and phloem sap of Maurandya barclayana, Lophospermum erubescens, and Brassica napus. *PLoS One* **9**, e87689.
- Loque, D., and von Wiren, N. (2004). Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. *J Exp Bot* **55**, 1293-1305.
- Lothier, J., Gaufichon, L., Sormani, R., Lemaitre, T., Azzopardi, M., Morin, H., Chardon, F., Reisdorf-Cren, M., Avicé, J.C., and Masclaux-Daubresse, C. (2011). The cytosolic glutamine synthetase GLN1;2 plays a role in the control of plant growth and ammonium homeostasis in Arabidopsis rosettes when nitrate supply is not limiting. *J Exp Bot* **62**, 1375-1390.
- Malagoli, P., and Le Deunff, E. (2014). An updated model for nitrate uptake modelling in plants. II. Assessment of active root involvement in nitrate uptake based on integrated root system age: measured versus modelled outputs. *Ann Bot* **113**, 1007-1019.
- Malagoli, P., Laine, P., Rossato, L., and Ourry, A. (2005a). Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (Brassica napus) from stem extension to harvest: I. Global N flows between vegetative and reproductive tissues in relation to leaf fall and their residual N. *Ann Bot* **95**, 853-861.
- Malagoli, P., Laine, P., Rossato, L., and Ourry, A. (2005b). Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (Brassica napus) from stem extension to harvest. II. An ¹⁵N-labelling-based simulation model of N partitioning between vegetative and reproductive tissues. *Ann Bot* **95**, 1187-1198.
- Malagoli, P., Laine, P., Le Deunff, E., Rossato, L., Ney, B., and Ourry, A. (2004). Modeling nitrogen uptake in oilseed rape cv Capitol during a growth cycle using influx kinetics of root nitrate transport systems and field experimental data. *Plant Physiology* **134**, 388-400.
- Martin, A., Lee, J., Kichey, T., Gerentes, D., Zivy, M., Tatout, C., Dubois, F., Balliau, T., Valot, B., Davanture, M., Terce-Laforgue, T., Quillere, I., Coque, M., Gallais, A., Gonzalez-Moro, M.B., Bethencourt, L., Habash, D.Z., Lea, P.J., Charcosset, A., Perez, P., Murigneux, A., Sakakibara, H., Edwards, K.J., and Hirel, B. (2006). Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production. *Plant Cell* **18**, 3252-3274.
- Masclaux-Daubresse, C., and Chardon, F. (2011). Exploring nitrogen remobilization for seed filling using natural variation in Arabidopsis thaliana. *J Exp Bot* **62**, 2131-2142.
- Masclaux-Daubresse, C., Carrayol, E., and Valadier, M.H. (2005). The two nitrogen mobilisation- and senescence-associated GS1 and GDH genes are controlled by C and N metabolites. *Planta* **221**, 580-588.
- Masclaux-Daubresse, C., Reisdorf-Cren, M., and Orsel, M. (2008). Leaf nitrogen remobilisation for plant development and grain filling. *Plant Biol (Stuttg)* **10 Suppl 1**, 23-36.
- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L., and Suzuki, A. (2010). Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann Bot* **105**, 1141-1157.

- Masclaux, C., Valadier, M.H., Brugiére, N., Morot-Gaudry, J.F., and Hirel, B.** (2000). Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* **211**, 510-518.
- Mittasch, J., Bottcher, C., Frolov, A., Strack, D., and Milkowski, C.** (2013). Reprogramming the phenylpropanoid metabolism in seeds of oilseed rape by suppressing the orthologs of reduced epidermal fluorescence1. *Plant Physiology* **161**, 1656-1669.
- Moroney, J.V., Jungnick, N., Dimario, R.J., and Longstreth, D.J.** (2013). Photorespiration and carbon concentrating mechanisms: two adaptations to high O₂, low CO₂ conditions. *Photosynth Res* **117**, 121-131.
- Nakabayashi, K., Okamoto, M., Koshiba, T., Kamiya, Y., and Nambara, E.** (2005). Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. *Plant Journal* **41**, 697-709.
- Nakano, K., Suzuki, T., Hayakawa, T., and Yamaya, T.** (2000). Organ and cellular localization of asparagine synthetase in rice plants. *Plant and Cell Physiology* **41**, 874-880.
- Nesi, N., Delourme, R., Bregeon, M., Falentin, C., and Renard, M.** (2008). Genetic and molecular approaches to improve nutritional value of *Brassica napus* L. seed. *Comptes Rendus Biologies* **331**, 763-771.
- Nikovics, K., Blein, T., Peaucelle, A., Ishida, T., Morin, H., Aida, M., and Laufs, P.** (2006). The balance between the MIR164A and CUC2 genes controls leaf margin serration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 2929-2945.
- Obara, M., Sato, T., Sasaki, S., Kashiba, K., Nagano, A., Nakamura, I., Ebitani, T., Yano, M., and Yamaya, T.** (2004). Identification and characterization of a QTL on chromosome 2 for cytosolic glutamine synthetase content and panicle number in rice. *Theor Appl Genet* **110**, 1-11.
- Ochs, G., Schock, G., Trischler, M., Kosemund, K., and Wild, A.** (1999). Complexity and expression of the glutamine synthetase multigene family in the amphidiploid crop *Brassica napus*. *Plant Mol Biol* **39**, 395-405.
- Olea, F., Perez-Garcia, A., Canton, F.R., Rivera, M.E., Canas, R., Avila, C., Cazorla, F.M., Canovas, F.M., and de Vicente, A.** (2004). Up-regulation and localization of asparagine synthetase in tomato leaves infected by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant and Cell Physiology* **45**, 770-780.
- Oliveira, I.C., and Coruzzi, G.M.** (1999). Carbon and amino acids reciprocally modulate the expression of glutamine synthetase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **121**, 301-309.
- Orsel, M., Krapp, A., and Daniel-Vedele, F.** (2002). Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in *Arabidopsis*. Structure and gene expression. *Plant Physiology* **129**, 886-896.
- Orsel, M., Moison, M., Clouet, V., Thomas, J., Leprince, F., Canoy, A.-S., Just, J., Chalhoub, B., and Masclaux-Daubresse, C.** (2014). Sixteen cytosolic glutamine synthetase genes identified in the *Brassica napus* L. genome are differentially regulated depending on nitrogen regimes and leaf senescence. *J Exp Bot* **65**, 3927-3947.
- Ortega, J.L., Wilson, O.L., and Sengupta-Gopalan, C.** (2012). The 5' untranslated region of the soybean cytosolic glutamine synthetase beta(1) gene contains prokaryotic translation initiation signals and acts as a translational enhancer in plants. *Mol Genet Genomics* **287**, 881-893.
- Ortega, J.L., Moguel-Esponda, S., Potenza, C., Conklin, C.F., Quintana, A., and Sengupta-Gopalan, C.** (2006). The 3' untranslated region of a soybean cytosolic glutamine synthetase (GS1) affects transcript stability and protein accumulation in transgenic alfalfa. *Plant J* **45**, 832-846.
- Pageau, K., Reisdorf-Cren, M., Morot-Gaudry, J.F., and Masclaux-Daubresse, C.** (2006). The two senescence-related markers, GS1 (cytosolic glutamine synthetase) and GDH (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. *J Exp Bot* **57**, 547-557.

- Parkin, I.A., Gulden, S.M., Sharpe, A.G., Lukens, L., Trick, M., Osborn, T.C., and Lydiate, D.J. (2005). Segmental structure of the *Brassica napus* genome based on comparative analysis with *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **171**, 765-781.
- Parkin, I.A.P., Koh, C., Tang, H., Robinson, S.J., Kagale, S., Clarke, W.E., Town, C.D., Nixon, J., Krishnakumar, V., Bidwell, S.L., Denoeud, F., Belcram, H., Links, M.G., Just, J., Clarke, C., Bender, T., Huebert, T., Mason, A.S., Pires, J.C., Barker, G., Moore, J., Walley, P.G., Manoli, S., Batley, J., Edwards, D., Nelson, M.N., Wang, X., Paterson, A.H., King, G., Bancroft, I., Chalhoub, B., and Sharpe, A.G. (2014). Transcriptome and methylome profiling reveals relics of genome dominance in the mesopolyploid *Brassica oleracea*. *Genome Biology* **15**.
- Pilot, G., Stransky, H., Bushey, D.F., Pratelli, R., Ludewig, U., Wingate, V.P., and Frommer, W.B. (2004). Overexpression of GLUTAMINE DUMPER1 leads to hypersecretion of glutamine from Hydathodes of *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell* **16**, 1827-1840.
- Pingali, P.L. (2012). Green revolution: impacts, limits, and the path ahead. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 12302-12308.
- Potel, F., Valadier, M.-H., Ferrario-Méry, S., Grandjean, O., Morin, H., Gaufichon, L., Boutet-Mercey, S., Lothier, J., Rothstein, S.J., Hirose, N., and Suzuki, A. (2009). Assimilation of excess ammonium into amino acids and nitrogen translocation in *Arabidopsis thaliana*- roles of glutamate synthases and carbamoylphosphate synthetase in leaves. *FEBS Journal* **276**, 4061-4076.
- Pourtau, N., Jennings, R., Pelzer, E., Pallas, J., and Wingler, A. (2006). Effect of sugar-induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in *Arabidopsis*. *Planta* **224**, 556-568.
- Rathke, G.W., Behrens, T., and Diepenbrock, W. (2006). Integrated nitrogen management strategies to improve seed yield, oil content and nitrogen efficiency of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.): A review. *Agriculture Ecosystems & Environment* **117**, 80-108.
- Rentsch, D., Schmidt, S., and Tegeder, M. (2007). Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. *FEBS Lett* **581**, 2281-2289.
- Rossato, L., Laine, P., and Ourry, A. (2001). Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: nitrogen fluxes within the plant and changes in soluble protein patterns. *J Exp Bot* **52**, 1655-1663.
- Sakurai, N., Katayama, Y., and Yamaya, T. (2001). Overlapping expression of cytosolic glutamine synthetase and phenylalanine ammonia-lyase in immature leaf blades of rice. *Physiol Plant* **113**, 400-408.
- Sakurai, N., Hayakawa, T., Nakamura, T., and Yamaya, T. (1996). Changes in the cellular localization of cytosolic glutamine synthetase protein in vascular bundles of rice leaves at various stages of development. *Planta* **200**, 306-311.
- Santos, C., Pereira, A., Pereira, S., and Teixeira, J. (2004). Regulation of glutamine synthetase expression in sunflower cells exposed to salt and osmotic stress. *Scientia Horticulturae* **103**, 101-111.
- Schjoerring, J.K., Bock, J.G.H., Gammelvind, L., Jensen, C.R., and Mogensen, V.O. (1995). Nitrogen incorporation and remobilization in different shoot components of field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus* L) as affected by rate of nitrogen application and irrigation. *Plant and Soil* **177**, 255-264.
- Seabra, A.R., Carvalho, H., and Pereira, P.J. (2009). Crystallization and preliminary crystallographic characterization of glutamine synthetase from *Medicago truncatula*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **65**, 1309-1312.
- Seifi, H.S., Van Bockhaven, J., Angenon, G., and Hofte, M. (2013a). Glutamate Metabolism in Plant Disease and Defense: Friend or Foe? *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**, 475-485.
- Seifi, H.S., De Vleeschauwer, D., Aziz, A., and Höfte, M. (2014). Modulating plant primary amino acid metabolism as a necrotrophic virulence strategy. *Plant Signal Behav* **9**, e27995.
- Seifi, H.S., Curvers, K., De Vleeschauwer, D., Delaere, I., Aziz, A., and Hofte, M. (2013b). Concurrent overactivation of the cytosolic glutamine synthetase and the GABA shunt in the ABA-

- deficient sitiens mutant of tomato leads to resistance against *Botrytis cinerea*. *New Phytologist* **199**, 490-504.
- Sessions, A., Burke, E., Presting, G., Aux, G., McElver, J., Patton, D., Dietrich, B., Ho, P., Bacwaden, J., Ko, C., Clarke, J.D., Cotton, D., Bullis, D., Snell, J., Miguel, T., Hutchison, D., Kimmerly, B., Mitzel, T., Katagiri, F., Glazebrook, J., Law, M., and Goff, S.A.** (2002). A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system. *Plant Cell* **14**, 2985-2994.
- Singh, U.** (2005). Integrated nitrogen fertilization for intensive and sustainable agriculture. *Journal of Crop Improvement* **15**, 259-288.
- Sun, F., Yang, X., Li, Y., and Hou, X.** (2010). Molecular cloning and characterisation of cytoplasmic glutamine synthetase gene *BcGS1* from non-heading Chinese cabbage. *J Sci Food Agric* **90**, 891-897.
- Swarbreck, S.M., Defoin-Platel, M., Hindle, M., Saqi, M., and Habash, D.Z.** (2011). New perspectives on glutamine synthetase in grasses. *J Exp Bot* **62**, 1511-1522.
- Tabuchi, M., Abiko, T., and Yamaya, T.** (2007). Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot* **58**, 2319-2327.
- Tabuchi, M., Sugiyama, K., Ishiyama, K., Inoue, E., Sato, T., Takahashi, H., and Yamaya, T.** (2005). Severe reduction in growth rate and grain filling of rice mutants lacking *OsGS1;1*, a cytosolic glutamine synthetase1;1. *Plant J* **42**, 641-651.
- Tavernier, V., Cadiou, S., Pageau, K., Lauge, R., Reisdorf-Cren, M., Langin, T., and Masclaux-Daubresse, C.** (2007). The plant nitrogen mobilization promoted by *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus* leaves depends on fungus pathogenicity. *J Exp Bot* **58**, 3351-3360.
- Tegeder, M.** (2014). Transporters involved in source to sink partitioning of amino acids and ureides: opportunities for crop improvement. *J Exp Bot* **65**, 1865-1878.
- Tegeder, M., and Rentsch, D.** (2010). Uptake and partitioning of amino acids and peptides. *Mol Plant* **3**, 997-1011.
- The Arabidopsis Genome Initiative.** (2000). Sequence and analysis of the genome of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Medical Genetics* **37**, S31-S31.
- Thomsen, H.C., Eriksson, D., Moller, I.S., and Schjoerring, J.K.** (2014). Cytosolic glutamine synthetase: a target for improvement of crop nitrogen use efficiency? *Trends Plant Sci.*
- Tilsner, J., Kassner, N., Struck, C., and Lohaus, G.** (2005). Amino acid contents and transport in oilseed rape (*Brassica napus* L.) under different nitrogen conditions. *Planta* **221**, 328-338.
- Ueno, O., Yoshimura, Y., and Sentoku, N.** (2005). Variation in the activity of some enzymes of photorespiratory metabolism in C-4 grasses. *Ann Bot* **96**, 863-869.
- Unno, H., Uchida, T., Sugawara, H., Kurisu, G., Sugiyama, T., Yamaya, T., Sakakibara, H., Hase, T., and Kusunoki, M.** (2006). Atomic structure of plant glutamine synthetase: a key enzyme for plant productivity. *J Biol Chem* **281**, 29287-29296.
- van Rooyen, J.M., Abratt, V.R., Belrhali, H., and Sewell, T.** (2011). Crystal structure of Type III glutamine synthetase: surprising reversal of the inter-ring interface. *Structure* **19**, 471-483.
- Viard, A., Henault, C., Rochette, P., Kuikman, P., Flenet, F., and Cellier, P.** (2013). Nitrous oxide (N₂O), a greenhouse gas emitted from agricultural soils: emission inventories and mitigation pathways. *OCL - Oleagineux, Corps Gras, Lipides* **20**, 108-118.
- von Wiren, N., Gazzarrini, S., Gojon, A., and Frommer, W.B.** (2000). The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Curr Opin Plant Biol* **3**, 254-261.
- von Wittgenstein, N.J.J.B., Le, C.H., Hawkins, B.J., and Ehrling, J.** (2014). Evolutionary classification of ammonium, nitrate, and peptide transporters in land plants. *BMC Evol Biol* **14**.
- Wallsgrave, R.M., Turner, J.C., Hall, N.P., Kendall, A.C., and Bright, S.W.J.** (1987). Barley mutants lacking chloroplast glutamine-synthetase - Biochemical and genetic analysis. *Plant Physiology* **83**, 155-158.
- Wang, J., Long, Y., Wu, B., Liu, J., Jiang, C., Shi, L., Zhao, J., King, G.J., and Meng, J.** (2009). The evolution of *Brassica napus* FLOWERING LOCUS T paralogues in the context of inverted chromosomal duplication blocks. *BMC Evol Biol* **9**.

- Wang, X., Wang, H., Wang, J., Sun, R., Wu, J., Liu, S., Bai, Y., Mun, J.H., Bancroft, I., Cheng, F., Huang, S., Li, X., Hua, W., Freeling, M., Pires, J.C., Paterson, A.H., Chalhoub, B., Wang, B., Hayward, A., Sharpe, A.G., Park, B.S., Weisshaar, B., Liu, B., Li, B., Tong, C., Song, C., Duran, C., Peng, C., Geng, C., Koh, C., Lin, C., Edwards, D., Mu, D., Shen, D., Soumpourou, E., Li, F., Fraser, F., Conant, G., Lassalle, G., King, G.J., Bonnema, G., Tang, H., Belcram, H., Zhou, H., Hirakawa, H., Abe, H., Guo, H., Jin, H., Parkin, I.A., Batley, J., Kim, J.S., Just, J., Li, J., Xu, J., Deng, J., Kim, J.A., Yu, J., Meng, J., Min, J., Poulain, J., Hatakeyama, K., Wu, K., Wang, L., Fang, L., Trick, M., Links, M.G., Zhao, M., Jin, M., Ramchiary, N., Drou, N., Berkman, P.J., Cai, Q., Huang, Q., Li, R., Tabata, S., Cheng, S., Zhang, S., Sato, S., Sun, S., Kwon, S.J., Choi, S.R., Lee, T.H., Fan, W., Zhao, X., Tan, X., Xu, X., Wang, Y., Qiu, Y., Yin, Y., Li, Y., Du, Y., Liao, Y., Lim, Y., Narusaka, Y., Wang, Z., Li, Z., Xiong, Z., and Zhang, Z. (2011). The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. *Nat Genet* **43**, 1035-1039.
- Watanabe, A., Takagi, N., Hayashi, H., and Chino, M. (1997). Internal Gln/Glu ratio as a potential regulatory parameter for the expression of a cytosolic glutamine synthetase gene of radish in cultured cells. *Plant and Cell Physiology* **38**, 1000-1006.
- Watanabe, M., Balazadeh, S., Tohge, T., Erban, A., Giavalisco, P., Kopka, J., Mueller-Roeber, B., Fernie, A.R., and Hoefgen, R. (2013). Comprehensive Dissection of Spatiotemporal Metabolic Shifts in Primary, Secondary, and Lipid Metabolism during Developmental Senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **162**, 1290-1310.
- Wilkinson, J.Q., and Crawford, N.M. (1993). Identification and characterization of a chlorate-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate reductase structural genes NIA1 AND NIA2. *Molecular & General Genetics* **239**, 289-297.
- Wilson, K.A., McManus, M.T., Gordon, M.E., and Jordan, T.W. (2002). The proteomics of senescence in leaves of white clover *Trifolium repens* (L.). *Proteomics* **2**, 1114-1122.
- Wingler, A., Masclaux-Daubresse, C., and Fischer, A.M. (2009). Sugars, senescence, and ageing in plants and heterotrophic organisms. *J Exp Bot* **60**, 1063-1066.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V., and Provart, N.J. (2007). An "Electronic Fluorescent Pictograph" Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS One* **2**.
- Wong, H.K. (2004). Correlation of ASN2 Gene Expression with Ammonium Metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **134**, 332-338.
- Xu, G., Fan, X., and Miller, A.J. (2012). Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annu Rev Plant Biol* **63**, 153-182.
- Yamaya, T., and Kusano, M. (2014). Evidence supporting distinct functions of three cytosolic glutamine synthetases and two NADH-glutamate synthases in rice. *J Exp Bot*.
- Zou, J., Jiang, C., Cao, Z., Li, R., Long, Y., Chen, S., and Meng, J. (2010). Association mapping of seed oil content in *Brassica napus* and comparison with quantitative trait loci identified from linkage mapping. *Genome* **53**, 908-916.

Références additionnelles.

Alexander et al. (2008). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on glucosinolates as undesirable substances in animal feed, The EFSA Journal **590**, 1-76

Duffy M. (2014). Historical costs of crop production. In: Ag Decision Maker. Iowa State University Extension and Outreach.

FAO. (2009). Global agriculture towards 2050.

Fagard et al. (2014). Nitrogen metabolism meets phytopathology J. Exp. Bot. (2014) **65**, 5643-5656. doi: 10.1093/jxb/eru323

Gaufichon Laure. (2009). Caractérisation fonctionnelle des gènes codant l'asparagine synthétase chez *Arabidopsis thaliana* : rôle dans l'assimilation de l'ammonium et le métabolisme de l'azote. Thèse de doctorat, Université Paris Sud XI.

Gómez-Campo C, Prakash S. (1999) Origin and domestication. In Biology of Brassica Coenospecies. Edited by Gomez-Campo C. Elsevier, Amsterdam.

Jackson, D. P. (1991). In situ hybridisation in plants. In Molecular Plant Pathology: A Practical Approach (ed. D. J. Bowles, S. J. Gurr and M. McPherson). Oxford University Press.

Meyer C, Stitt M. (2001). Nitrate reduction and signalling. In: Lea PJ, Morot-Gaudry JF, eds. Plant nitrogen. Berlin: Springer-Verlag, 61–78.

Nagaharu U. (1935). Genome analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilisation. Jap J Bot **7**, 389-452.

Rochette P. (2008). Gestion des engrais minéraux et organiques : volatilisation de l'ammoniac. Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec.

United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2013). World Population Prospects: The 2012 Revision, Key Findings and Advance Tables. ESA/P/WP.227 (<http://esa.un.org/unpd/wpp/index.htm>)

Viard A, Hénault C, Rochette P, Kuikman P, Flénet F, Cellier P. (2013). Le protoxyde d'azote (N₂O), puissant gaz à effet de serre émis par les sols agricoles : méthodes d'inventaire et leviers de réduction. OCL **20**, 108-118.

Directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau, Journal officiel n° L 327 du 22/12/2000 p. 0001 - 0073

Directive 91/676/CEE du Conseil, du 12 décembre 1991, concernant la protection des eaux contre la pollution par les nitrates à partir de sources agricoles, Journal officiel n° L 375 du 31/12/1991 p. 0001 – 0008

Résumé

Le colza d'hiver (*Brassica napus*) est cultivé pour l'huile contenue dans ses graines ainsi que pour les tourteaux qui sont une source de protéines pour l'alimentation animale. La culture de colza demande de forts apports d'azote et cette espèce est caractérisée par sa faible efficacité d'utilisation de l'azote. Une forte proportion de l'azote absorbé est restituée au sol lors de la chute précoce des feuilles au stade végétatif. L'amélioration de la remobilisation de l'azote est donc de première importance pour améliorer le rendement de cette culture tout en satisfaisant le besoin de réduction des intrants. La glutamine et l'asparagine jouent un rôle important dans le transport de l'azote au sein de la plante, notamment au cours de la sénescence foliaire. Les deux familles multigéniques des glutamine synthétases cytosoliques (*GLN1*) et des asparagine synthétases (*ASN*) assurent leur synthèse. Ce travail de thèse s'est intéressé à ces enzymes chez deux Brassicacées : le colza et *Arabidopsis thaliana*. Dans un premier temps, l'expression des gènes *GLN1* a été étudiée chez *Arabidopsis* par une combinaison d'approches de biologie moléculaire, cellulaire et de cytologie. Les spécificités d'expression de chacun des cinq gènes d'*Arabidopsis* ont été mises en évidence. L'identification des gènes *BnaGLN1* chez *Brassica napus* a permis une analyse de leur expression en fonction de l'âge des feuilles et de la disponibilité en azote. Les profils d'expression observés chez le colza se sont révélés similaires à ceux des gènes homologues d'*Arabidopsis*, amenant l'hypothèse d'une conservation des fonctions chez les deux espèces. Le rôle des gènes *GLN1* d'*Arabidopsis* dans la remobilisation de l'azote vers les graines a été étudié grâce à un marquage ^{15}N effectué sur des mutants simples. Le rôle des gènes *GLN1* dans la remobilisation de l'azote des tissus végétatifs vers les tissus reproducteurs a été mis en évidence sans toutefois cibler spécifiquement une isoforme. L'étude de la famille *ASN* chez *Arabidopsis* a permis de mettre en évidence des profils d'expression spécifiques en fonction des organes, de l'âge des tissus et de la disponibilité en azote pour chacun des trois gènes. Le marquage ^{15}N a également révélé une implication des gènes *ASN1* et *ASN2* dans la remobilisation de l'azote de la rosette vers les tissus reproducteurs. Les travaux présentés dans ce manuscrit sont une base pour de futures approches translationnelles vers le colza.

Abstract

Winter oilseed rape (*Brassica napus*) is grown for its oil-rich seeds and for proteins, used in animal feed cake. It requires high nitrogen inputs due to the low efficiency of nitrogen utilization that characterizes this species. A large proportion of absorbed nitrogen is indeed returned to the soil when leaves fall. Improving nitrogen remobilization to promote seed filling is then required to improve yield and limit fertilizer use. Asparagine and glutamine are important amino acids for phloem translocation. This thesis focuses on the two multigenic families in charge of asparagine and glutamine synthesis: cytosolic glutamine synthetase (*GLN1*) and asparagine synthetase (*ASN*). Studies were performed on the two Brassicaceae, rapeseed and *Arabidopsis thaliana*. The *GLN1* gene expressions were investigated in *Arabidopsis* by a combination of molecular biology and cytology. The five *GLN1* genes are differentially expressed in *Arabidopsis* depending on ageing and nitrogen availability. The identified *BnaGLN1* genes in *Brassica napus* also showed age and nitrogen dependent expressions. Interestingly, expression profiles were similar between homologous genes in *Arabidopsis* and rapeseed, suggesting that homologous genes share similar function in the two species. The role of *Arabidopsis GLN1* genes for nitrogen remobilization to the seeds was monitored using ^{15}N tracing experiments on individual mutants. The *GLN1* genes play a role in the remobilization of nitrogen from the rosette leaves to the reproductive organs. However, their effect is weak and non-specific of one GS1 isoform. *ASN* genes also presented specific expression profiles depending on organs, age and nitrogen availability. The ^{15}N tracing revealed that *ASN1* and *ASN2* are both involved in nitrogen remobilization from the rosette to the seeds. Our studies provide a basis for future translational approaches to improve oilseed rape.